Aus dem C. & O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. A. Hopf)

Die Isolierung zellfreier Protein synthetisierender Systeme aus Gehirn - biologische Eigenschaften und regulatorische Mechanismen

HABILITATIONSSCHRIFT
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi
für das Gebiet der
experimentellen Neurologie und Psychiatrie

vorgelegt von

Dr. med. BERND GOERTZ

Düsseldorf 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544316_0082

Aus dem C. & O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. A. Hopf)

Die Isolierung zellfreier Protein synthetisierender Systeme aus Gehirn - biologische Eigenschaften und regulatorische Mechanismen

HABILITATIONSSCHRIFT
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi
für das Gebiet der
experimentellen Neurologie und Psychiatrie

vorgelegt von
Dr. med. BERND GOERTZ

Düsseldorf 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: aku-Fotodruck, Gleueler Str. 217,
5000 Köln 41, Tel. 0221/43 72 57

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG ..... S. 2

2. MATERIAL und METHODEN 4

Chemikalien

Apparate

Versuchstiere

Ablauf der Proteinsynthese

Isolierung der Ribonukeoproteid-Partikel

Hirn - Enzyme

tRNS

Mitochondrien und Synaptosomen

Standardsysteme des Aminosäuren-Einbaus

Standardsysteme der Aminoacylierung

Mitochondriale Systeme

Synaptosomale Systeme

3. ERGEBNISSE 29

1. Der Protein synthetisierende Apparat 29

a. Polysomen und Ribosomen

b. tRNS

c. Mitochondrien und Synaptosomen

d. Enzymfraktionen

2. Eigenschaften der zellfreien Systeme 38

a. Polysomales System

a.1. Polysomenkonzentration

a.2. Enzymkonzentration

a.3. tRNS-Abhängigkeit

a.4. Magnesium-Konzentration

a.5. Inkubationszeit

a.6. Optimierte polysomale Systeme

b. Ribosomales System

c. Akzeptorfunktion der tRNS

d. Mitochondriales System

e. Synaptosomales System

3. Spezifität der Akzeptorfunktion 56

4. Einfluß von Inhibitoren der Proteinsynthese auf die zellfreien Systeme 58

5. Aktivität der zellfreien Systeme aus Gehirn neugeborener Mäuse 62

6. Einfluß psychotroper Substanzen 74

7. Wirkung von Neurotransmittern 79

7.a. γ- Aminobuttersäure

7.b. Andere Transmitter

4. DISKUSSION 88

5. ZUSAMMENFASSUNG 116

6. LITERATURHINWEISE 119

Abkürzungen :

ADP = Adenosin - 5'- diphosphat

ATP = Adenosin - 5'- triphosphat

GTP = Guanosin - 5'- triphosphat

CTP = Cytidin - 5'- triphosphat

DNS = Desoxyribonukleinsäure

mRNS = Messenger-Ribonukleinsäure

tRNS = Transfer -Ribonukleinsäure

Poly U = Polyuridylsäure

Poly A = Polyadenylsäure

RNP = Ribonukleoproteid-Partikel

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

SDS = Natrium-dodecylsulfat

TCA = Trichloressigsäure

OTC = Oxytetracyclin

GABA = γ-Aminobuttersäure

1 A_{260} - Einheit ist die Menge an RNS, deren Absorption bei der Wellenlänge von 260 nm (d=1 cm), multipliziert mit dem Volumen der Lösung in ml, 1,0 ergibt

EINFÜHRUNG

Die Untersuchung der Eigenschaften von Nukleinsäuren und Proteinen leistete nach der Entdeckung der materiellen Basis der genetischen Information in Gestalt der DNS (AVERY,1943) einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Vererbung und der Steuerung dieses elementaren Lebensvorgangs (1) . Auch in der medizinischen Forschung gewinnt die so gewonnene Kenntnis der chemischen Mechanismen der Genexpression zunehmend an Bedeutung, da sie ein besseres Verständnis der Ursachen verschiedener Erkrankungen und damit die Entwicklung neuer Konzepte in deren Behandlung ermöglicht. Es sind bereits Krankheiten bekannt, deren Ursache eine Änderung der genetischen Information der DNS selbst ist. Diese hat eine fehlerhafte Transkription und die Synthese eines pathologischen Proteins zur Folge. Beispiel einer solchen Molekularkrankheit ist neben anderen Hämoglobinopathien die Sichelzell-Anämie , der ursächlich der Austausch einer einzigen Base im Bereich des codogenen Abschnitts der DNS für das Hämoglobin (Transversion Adenin-Thymin) zugrunde zu liegen scheint. Bei einer anderen Gruppe dieser Molekularkrankheiten ist die strukturelle Schädigung der DNS selbst nicht bekannt. Es gelingt jedoch der Nachweis einer gestörten Synthese von Proteinen mit spezifischer Funktion an den Ribosomen. Hier zu nennen ist die ß-Thalassämie, bei der ein Mangel an Initiations-Faktoren für die Synthese des Hämoglobins nachgewiesen werden kann. Bei zahlreichen anderen Krankheiten schließlich legt die bekannte Wirkungskette vom fehlenden oder defekten Enzym zum klinischen Syndrom die Vermutung einer primären Störung in der Basensequenz der DNS ebenfalls nahe. Hier einzuordnen wäre eine Reihe von Erkrankungen des Nervensystems, die einerseits wie die endogenen System-

atrophien als struktur- oder enzymchemische Defekte infolge einer "molekularen Mißbildung" aufgefaßt werden können. Andererseits wären hier funktionelle metabolische Enzephalopathien wie die intermittierende hepatische Porphyrie einzugliedern. Die genuinen Epilepsien dürften ebenso zu dieser Gruppe von Erkrankungen gehören wie letztlich auch die endogenen Psychosen, bei denen der Nachweis der Heredität zumindestens auf eine polygenetische Ätiologie durch das Zusammentreffen molekularer Disposition und exogener Exposition hinweist (2 - 4).

Unabhängig von der Erforschung bisher unbekannter Ursachen zahlreicher Erkrankungen kann die Untersuchung des Stoffwechsels der Nukleinsäuren und Proteine auch zu einem besseren Verständnis physiologischer Leistungen einzelner Organe führen. Diese Annahme rechtfertigt die Bemühungen , auch bei der Beschäftigung mit psychischen Ereignissen die Ebene phänomenologischer Beschreibung zu verlassen und nach Zusammenhängen zwischen den diesen zugrunde liegenden spezifischen Leistungen des Gehirns und molekularen Vorgängen in diesem Organ zu suchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Einblick in den Mechanismus der Proteinsynthese im Gehirn zu gewinnen und regulatorische Einflüsse auf den Protein synthetisierenden Apparat der Nervenzellen zu erkennen. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen mit der Technik der zellfreien Proteinsynthese.

MATERIAL und METHODEN.

Chemikalien: ^{14}C-Aminosäuren und ^{14}C-Proteinhydrolysat wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen. ATP, GTP , Dithiotreitol, Phosphokreatin, Kreatinphosphokinase, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, RNase und DNase stammten von der Boehringer Mannheim GmbH. Proteinase K war ein Produkt der Firma Merck AG , Darmstadt. Natriumdesoxycholat, Triton X-100 und Digitonin waren Produkte der Serva GmbH, Heidelberg. Als künstliche messenger wurden Poly U und Poly A der Firma Miles Inc. , Elkhart,Indiana, verwendet. Als Szintillatoren dienten die Präparate Liquifluor, Aquasol und Econofluor der Firma NEN Chemicals,Dreieichenhain. Zur Gel- und Ionenaustauscherchromatografie wurden Sephadex-Gele der Firma Pharmacia,Uppsala verwendet,von der auch Ficoll bezogen wurde. Acrylamid und N,N`Methylen-bis-acrylamid wurden von der Fluka AG, Neu-Ulm, angefordert. Außerdem wurden übliche Laborchemikalien benutzt.

Apparate: Die fraktionierte Zellzentrifugation wurde in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge SS-3 der Firma Sorvall und in der präparativen Ultrazentrifuge Omega II der Firma Heraeus-Christ durchgeführt. Zur Fraktionierung der Enzyme diente eine ISCO-Einheit mit Absorptionsmonitor und Fraktionssammler. UV-Absorptionsspektren wurden registriert mit dem Spektralphotometer UV 200 der Firma Shimadzu. Zur Gel-Elektrophorese wurde ein Gerät der Firma Shandon herangezogen. Die Szintillationsmessung erfolgte im Tricarb-Zähler der Firma Packard.

Alle Glaswaren wurden vor der Verwendung sterilisiert oder mit Chrom-Schwefelsäure gereinigt.

Versuchstiere : Als Versuchstiere dienten neugeborene und erwachsene Mäuse eines NMRI-Stammes (Naval Medical Research Institute, U.S.A.), der in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf weitergezüchtet wird. Die Tiere wurden bis zur Tötung mit der Standarddiät Nr. 1314 (Fa Altromin GmbH , Lage) ad libitum gefüttert. Nach der Dekapitation wurden die Gehirne rasch entnommen, in eiskaltem Puffer kurz von Blut freigespült und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Zeitspanne von mehr als 30 Sekunden wurde zwischen der Tötung und dem Einfrieren des biologischen Materials nicht überschritten. Aufbewahrt wurden die Gehirne bei einer Temperatur von - 80 ^{o} C. Zellfreie Lebersysteme wurden aus den Organen der gleichen Versuchstiere isoliert. Auch die Lebern wurden unmittelbar nach der Dekapitation entnommen, gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Einige vergleichende Experimente zur Charakterisierung des Protein synthetisierenden Apparats wurden in bakteriellen Systemen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente dabei der Stamm E. coli MRE 600 (RNase-frei). Die Züchtung erfolgte in einem üblichen Minimalmedium. Geerntet wurden die Bakterien am Ende der logarithmischen Wachstumsphase.

Den Zugang zu dem Problemkreis der vorliegenden Arbeit soll eine einführende kurze Beschreibung der beteiligten Moleküle und der Einzelschritte im Ablauf der Proteinsynthese in der Zelle erleichtern. Unsere bisherigen Kenntnisse über diesen elementaren Lebensprozess gründen im wesentlichen auf den Arbeiten von MATTHAEI und NIRENBERG (5 - 6). Auf einige in letzter Zeit erschienene zusammenfassende Arbeiten über

den Mechanismus der Proteinsynthese in Pro- und Eukaryonten sei ebenfalls hingewiesen (7 - 9) .
Der Ablauf der Proteinsynthese läßt sich kurz zusammengefaßt wie folgt darstellen : funktionelle Abschnitte der DNS wirken als Matrize für die Synthese der RNS, wobei in Abhängigkeit von der Nukleotidsequenz des abgelesenen Stranges die komplementären Mononukleotide aneinandergereiht werden. Dieser Mechanismus der RNS-Synthese wird als Transkription bezeichnet. Handelt es sich bei der transkribierten RNS um mRNS , so dient diese wiederum als Matrize , die die richtige Reihenfolge der Aminosäuren in dem zu bildenden Protein gewährleistet. Dabei bilden je 3 Basen der mRNS den Code für eine Aminosäure. Bindeglied zwischen diesen Basen-Triplets und den Aminosäuren sind die für jede Aminosäure spezifischen tRNS. Diese werden einerseits durch die ebenfalls spezifischen Aminoacyl-tRNS-Synthetasen (Synthetasen) an ihrem 3'OH-Ende mit der zugehörigen Aminosäure beladen. Andererseits besitzen sie ein dem gültigen Code der mRNS komplementäres Anticodon. Die der Information der mRNS entsprechende Folge der Aminosäuren in der wachsenden Peptidkette wird durch die Bindung von Codon und Anticodon ermöglicht.

Die Synthese der Eiweißkörper erfolgt in der Zelle vorwiegend an den Ribosomen. Diese liegen in Bakterien in freier Form vor, während sie in den eukaryotischen Zellen vorwiegend an die endoplasmatischen Membranen gebunden sind. Die Ribosomen bestehen aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Zwischen den bakteriellen und den eukaryotischen Ribosomen bestehen erhebliche Unterschiede, die in dem abweichenden Se-

dimentationsverhalten der Ribosomen und ihrer Bausteine besonders deutlich werden : Sedimentationskonstante des bakteriellen Ribosoms 7o s , Untereinheiten 3o s + 5o s , Molekulargewicht ca 2,7 x $1o^6$ d ; Sedimentationskonstante des eukaryotischen Ribosoms 8o s , Untereinheiten 4o s + 6o s , Molekulargewicht ca 4 x $1o^6$ d . Der Prozess der Umsetzung der Nukleotidsequenz der mRNS in die Reihenfolge der Aminosäuren am Ribosom wird als Translation bezeichnet. Auch diese ist in Pro- und Eukaryonten im Prinzip ähnlich, weist im Detail jedoch deutliche Unterschiede auf. Untergliedert wird der Prozess der Translation der genetischen Information in drei Phasen : Initiation, Elongation und Termination.

Während der Initiation kommt es zur Anlagerung der mRNS an das Ribosom, zur Bindung der Initiations-tRNS und zur Verknüpfung der ribosomalen Untereinheiten. Die Übersetzung der Information der mRNS beginnt an definierten Stellen, da als spezifisches Initiationssignal das Basen-Triplet AUG dient. AUG ist aber der komplementäre Code für die Methionin-spezifische tRNS, die so zur Initiations-tRNS wird. Im Gegensatz zu den Eukaryonten ist die Methionyl-$tRNS_F$ der Bakterien formyliert; dadurch wird der Einbau des Methionins dieser Initiations-tRNS als inneres Glied der wachsenden Peptidkette verhindert. Den Start der Proteinsynthese steuern mehrere spezifische Initiationsfaktoren (bei Eukaryonten bisher 7 bekannt). Diese verursachen zunächst die Dissoziation des kompletten Ribosoms in die Untereinheiten und katalysieren dann die Bildung des Initiationskomplexes durch Bindung der Initiation-tRNS und der mRNS. Schließlich erfolgt die Assoziation der großen Untereinheit.

Die Elongationsphase beginnt mit der Bindung der nachfolgen -

den tRNS am Eingang des kompletten Ribosoms. Diese erfolgt nur dann, wenn der Ausgang des Ribosoms bereits durch die Peptidyl-tRNS besetzt ist. Danach kommt es zu Peptidknüpfung zwischen der Aminoacyl-tRNS am Eingang und der Peptidyl-tRNS am Ausgang des Ribosoms, an dem die unbeladene tRNS zurückbleibt. Diese wird dann abgelöst, während gleichzeitig durch eine Konformationsänderung des Ribosoms die am Eingang befindliche Peptidyl-tRNS an den Ausgang gelangt und das Ribosom selbst um ein Triplett an der mRNS weitergleitet. Auf diese Weise oszilliert während der der Proteinsynthese die wachsende Peptidkette zwischen Eingang und Ausgang des Ribosoms hin und her. Die Elongationsphase wird gesteuert durch die Elongationsfaktoren Aminoacyltransferase I und II in Eukaryonten , in Bakterien durch die Faktoren T_u , T_s und G.

Ähnlich wie die Initiation der Proteinsynthese wird auch ihre Termination durch spezifische Nukleotidsequenzen der mRNS signalisiert: UAA , UAG , UGA . Diese Terminationscodons binden keine komplementären tRNS-Moleküle, sondern bei Eukaryonten ein, bei Prokaryonten 3 unterschiedliche Terminationsproteine, die RF-Faktoren. Nach der Bindung des Proteins mit RF-Aktivität wird das am Ribosom geknüpfte Polypeptid enzymatisch freigesetzt. Die Ribosomen lösen sich von der mRNS und zerfallen durch die Wirkung der Initiationsfaktoren wieder in ihre Untereinheiten.

Nach dem beschriebenen Mechanismus werden in Bakterien pro Sekunde und Ribosom etwa 5o Aminosäuren in die wachsende Polypeptidkette eingebaut, während in Eukaryonten die Synthese der Proteine offenbar erheblich langsamer abläuft. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Translationsprozesses scheint dabei die Bildung des Initiationskomplexes

zu sein.

Unabhängig von der Peptidknüpfung im Bereich der freien und membrangebundenen Ribosomen besitzen auch die Mitochondrien autonome Protein synthetisierende Systeme,die sich in ihren Eigenschaften deutlich von dem cytoplasmatischen Apparat unterscheiden (1o - 13). Die Struktur der mitochondrialen Ribosomen und die Formylierung der Initiations-tRNS ähneln dabei ebenso dem System von Prokaryonten wie das Verhalten des gesamten Protein synthetisierenden Apparates gegenüber Inhibitoren der Eiweißsynthese. Der prozentuale Anteil der in den Mitochondrien synthetisierten Proteine liegt allerdings bei nur o.5 Prozent der im Cytoplasma gebildeten Eiweißkörper (14) . Ebenso wie die Bedeutung der mitochondrialen DNS ist die Funktion des autonomen Apparates der Proteinsynthese in diesen Zellorganellen noch weitgehend ungeklärt.

In den Nervenzellen erfolgt der Stoffaustausch zwischen Zellkörper und Nervenendigungen im allgemeinen über die Systeme des schnellen und langsamen axonalen Transports. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß unabhängig von diesen Transportsystemen im Bereich der Synapsen selbst Proteine synthetisiert werden. Weitgehend gereinigt können die Synapsen als "Synaptosomen"-Fraktion durch Zentrifugation von Gehirnhomogenaten über diskontinuierliche Zuckergradienten isoliert werden (15-16). Bisherige Untersuchungen deuten daraufhin, daß es im Bereich der Nervenendigungen 2 verschiedene Protein synthetisierende Systeme gibt, ein synaptoplasmatisches System und ein autonomes System der synaptischen Mitochondrien (17 - 19). Als endgültig geklärt kann die Frage nach 2 oder einem übergeordneten Protein synthetisierenden System im Bereich der Synapsen jedoch nicht angesehen werden,zumal

in jüngster Zeit auch eine von Ribosomen unabhängige Inkorporation von Aminosäuren in synaptisches säurefällbares Protein beschrieben wird (2o) .

Zur Untersuchung des Proteinstoffwechsels im Gehirn und seiner Regulationsmechanismen verwenden wir die Technik der zellfreien Proteinsynthese (21,22). In diesen in vitro-Testsystemen sind in einem Gesamtvolumen von 1oo bis 25o µl folgende Einzelkomponenten enthalten: Ribosomen, mRNS, tRNS, Enzyme und Proteinfaktoren, GTP, ATP und ein regenerierendes System, SH-Gruppenreagentien, ^{14}C-Aminosäuren . Diese einzelnen Komponenten des Protein synthetisierenden Apparates werden in ein Puffer-System eingebracht, daß die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,6 gewährleistet. Während in bakteriellen zellfreien Systemen ausschließlich Ribosomen Verwendung finden, können in die entsprechenden Testansätze aus Eukaryonten verschiedene Ribonucleoprotein-Spezies eingesetzt werden : Polysomen, Ribosomen, Mikrosomen. Polysomen sind Komplexe von 4 oder mehr Ribosomen mit den zelleigenen mRNS, die bei der Fraktionierung eukaryotischer Zellen gemeinsam isoliert werden können. Die Mikrosomen sind eine weitgehend ungereinigte Fraktion von Polysomen und Ribosomen, die noch an die endoplasmatischen Membranen gebunden sind.

In den zellfreien Systemen dient die gemeinsam mit den Ribosomen in der Polysomenfraktion isolierte mRNS als Matrize für die in vitro-Synthese der hirneigenen Proteine. Wegen der Universalität des genetischen Code übersetzen die zellfreien Systeme aus Gehirn jedoch auch die Information heterologer Matrizen, die in Form künstlicher homopolymerer Polynukleotide angeboten werden können. Zu diesen künstlichen

mRNS gehören Poly U, das die Synthese von Poly-Phenylalanin codiert und Poly A, das als Matrize für die Bildung von Poly -Lysin dient. Diese homopolymeren Nukleinsäuren finden vor - wiegend Verwendung in bakteriellen Systemen der zellfreien Proteinsynthese, da aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit bakterieller mRNS eine präparative Isolierung prokaryotischer messenger-Ribosomen-Komplexe schwer möglich ist.
Die zur Proteinsynthese erforderlichen tRNS-Moleküle müssen vor dem Einsatz in die zellfreien Systeme ebenfalls in reiner Form aus Gehirngewebe isoliert werden.
Enzyme und Faktoren, die zur zellfreien Inkorporation markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein erforderlich sind, sind entweder an die Fraktion der Polysomen gebunden oder in dem bei der Zellfraktionierung gewonnenen postmikrosomalen Überstand (S-1oo) enthalten (7 - 9). Sie können entweder ungereinigt eingesetzt werden, oder aber durch chromatografische Trennverfahren und fraktionierte Aussalzungen vorher angereichert und gereinigt werden.
Da der Ablauf der Proteinsynthese ein Energie verbrauchender Prozess ist, muß diese in Form energiereicher Phosphate (ATP, GTP) ebenfalls in die Testansätze eingebracht werden. ATP wird dabei mit einem regenerierenden System gekoppelt : Phosphoenolpyruvat-Pyruvatkinase der Phosphokreatin-Kreatinphosphokinase.
Bei der Suche nach einer geeigneten Technik zur Isolierung von Ribonukleoproteid-Partikeln aus Gehirn wurden zunächst Präparationstechniken geprüft, die sich im wesentlichen durch die Zusammensetzung des Extraktionspuffers, die Eigenschaften der bei der Präparation benutzten Detergentien und den Zeitpunkt ihrer Zugabe zum Zellextrakt, oder durch die Form des verwendeten Saccharose-Gradienten (linear,diskontinuierlich) unter-

schieden (23-25). Standardisiert wurde dann ein Isolierungsverfahren, das sich an die von MUNRO et al., FALWEY und STAEHELIN und von LERNER et al. angegebenen Präparationsmethoden anlehnte (27-29).

Bei der Präparation von Ribonukleoproteidpartikeln aus tierischen Geweben muß berücksichtigt werden, daß diese anders als in Bakterien in den Zellen von Eukaryonten vorwiegend an die endoplasmatischen Membranen gebunden sind. In der Leber sind nahezu alle Ribosomen membrangebunden, im Gehirn liegen sie dagegen zur Hälfte auch in freier Form vor (30). Durch Homogenisation in einem geeigneten Puffersystem werden die endoplasmatischen Membranen zerstört und es entstehen sphärische Partikel, an deren Oberflächen die Ribosomen angeheftet sind. Diese Partikel bilden die bei einer Geschwindigkeit von 100000 x g sedimentierende Mikrosomen -Fraktion. Die Fraktion der Hirn-Mikrosomen besteht demnach aus teils membrangebundenen teils aber auch freien Ribosomen und Ribosomenverbänden, die durch mRNS-Stränge zu Polysomen geformt werden (31). Einzelne Ribosomen in dieser Fraktion liegen auch di- oder trimerisiert vor . Ribosomen und Polysomen können durch Behandlung der Mikrosomen-Fraktion mit einem Detergens von den endoplasmatischen Membranen abgelöst werden. Reine Polysomen enthält man durch fraktionierte Zentrifugation über diskontinuierliche Saccharose-Gradienten, an deren Grenzflächen bei der Sedimentierung die verunreinigenden Partikel hängenbleiben. Reine Ribosomen werden aus der mit Detergentien behandelten Mikrosomen-Fraktion durch Inkubation mit einem ^{12}C-Proteinhydrolysat als " run off ribosomes " gewonnen (32).

Im einzelnen wurden etwa 1 bis 10 Gramm der bei - 80° C aufbewahrten Gehirne auf 0° C aufgetaut und mit dem dreifachen

Volumen eines Präparationspuffers folgender Zusammensetzung versetzt :

TRIS-HCl, pH 7.4 . o,o2 M , Magnesiumazetat o,o1 M , KCl o,1 M , Dithiotreitol o,oo1 M , Saccharose (frisch) o,25 M. Alle Präparationsschritte wurden bei einer Temperatur von O bis 3° C durchgeführt. Die Gehirne wurden zunächst mit einer Schere zerkleinert. Dann wurden sie im POTTER-ELVEHJEM -Homogenisator durch 5 bis 6 maliges Auf- und Abwärtsbewegen des motorgetriebenen Teflon-Pistills bei 1ooo Upm homogenisiert. Durch 2 malige Zentrifugation des Homogenats bei 1ooo x g wurden Zelltrümmer und Kerne abzentrifugiert, erneut extrahiert und schließlich verworfen. Die Überstände wurden vereinigt und bei 12ooo x g zentrifugiert. Der Überstand = S-12 I (postmitochondrialer Überstand) wurde zunächst in Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde mit Extraktionspuffer versetzt, kurz homogenisiert und erneut bei 12ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand = S-12IA wurde mit S-12 I vereinigt; S-12 I diente zur Isolierung freier Polysomen und Ribosomen. Zur Präparation der membrangebundenen Ribonukleoproteidpartikel wurde das Pellet bei 12ooo x g (Mitochondrien-Rohfraktion) erneut in Puffer aufgenommen und homogenisiert. Dann wurde ein Detergens bis zu einer Endkonzentration von 1 Prozent hinzugegeben und 15 min gerührt. Das Homogenat wurde anschließend erneut bei 12ooo x g zentrifugiert. Der Überstand = S-12 II wurde zunächst in Eis aufbewahrt , das Pellet wurde wie beschrieben noch zweimal reextrahiert. Die so gewonnenen Überstände S-12 II A und S-12 II B wurden mit S-12 II vereinigt und zur Präparation der membrangebundenen Polysomen und Ribosomen verwendet. Zur Zentrifugation der Polysomen wurden die postmitochondrialen

Überstände auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten von o,5 - 2 M geschichtet und 6 h bei 135ooo x g (8 x 35 Winkelrotor) zentrifugiert. Dabei wurden allein die schweren Polysomen pelletiert, während die Ribosomen an der Grenze zwischen o,5 M und 2 M Saccharose hängenblieben. Diese Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgehoben, mit Puffer auf das 1o bis 2o fache verdünnt und erneut 4 h durch eine 1 M Saccharose-Lösung zentrifugiert. Dabei pelletierten die Ribosomen. Polysomen und Ribosomen wurden nach Abheben der Überstände und vorsichtigem Freispülen der Wandflächen der Zentrifugengläschen in einem begrenzten Volumen Puffer suspendiert und mit einem DOUNCE-Homogenisator homogenisiert.Verunreinigungen wurden durch eine Zentrifugation 1o min bei 12ooo x g entfernt. Die Lösungen wurden dann in Portionen a 5oo µl bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Ausbeute an Polysomen und Ribosomen bei den einzelnen Präparationen wurde mengenmäßig erfasst durch die Bestimmung der Absorption bei 26onm im Spektralphotometer PMQ II der Firma ZEISS. Dabei wurden folgende Beziehungen zugrundegelegt :

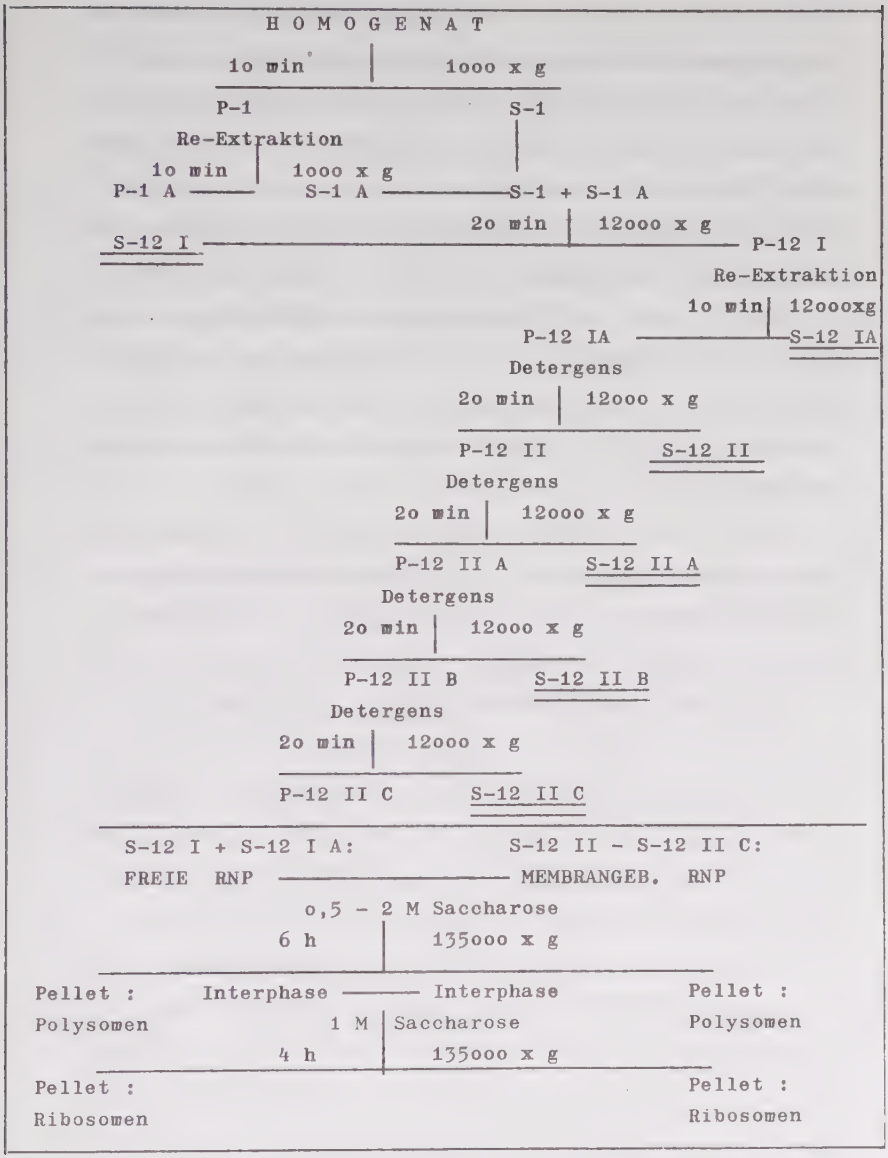
Ribosomen: 13,1 A_{26onm} = 1 mg 8o s-Ribosom = o,25 nMol (33);

Polysomen: 11,2 A_{26onm} = 1 mg Polysomen (34) .

Eine zusammenfassende Darstellung des verwendeten Präparationsschemas zur Isolierung freier und membrangebundener Polysomen und Ribosomen aus Gehirn ist in Abbildung 1 enthalten.

Abbildung 1 :

Präparations-Schema für freie und membrangebundene Ribonukleoproteid-Partikel aus Gehirn.



P = Pellet ; S = Supernatant ; Einzelheiten unter Methoden.

Die zur Synthese von Hirnproteinen erforderlichen Enzyme und Faktoren wurden zunächst ungereinigt in Form des postmikrosomalen Überstandes=S-100 eingesetzt, da diese lösliche Protein-Fraktion alle zur Inkorporation von Aminosäuren in säurefällbares Protein benötigten Enzyme enthält, die nicht an die Ribonukleoproteidpartikel assoziiert sind. Diese Rohfraktion erwies sich jedoch bei Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff in ihrer biologischen Aktivität als instabil. Die Chromatografie über Sephadex-G 25 , bei der Aminosäuren, Nukleotide und die im Extraktionspuffer enthaltene Saccharose beseitigt wurden, führte zunächst zu einer deutlichen Steigerung der Enzym-Aktivitäten (35). Eine zusätzliche Stabilisierung auch bei längerfristiger Aufbewahrung in Stickstoff wurde jedoch erst durch Präparation der pH - 5 -Enzyme erreicht (36).

Im einzelnen wurde der über Sephadex - G 25 chromatografierte postmikrosomale Überstand zunächst mit Extraktionspuffer bis auf ein Verhältnis von 9 ml Puffer/ g Hirngewicht verdünnt. Dann wurde unter vorsichtigem Rühren im Eis der pH - Wert der Lösung durch Zugabe 1 N Essigsäure auf 4,7 erniedrigt. Die Lösung wurde 30 Minuten im Eis belassen. Die in dieser Zeit ausfallenden Proteine wurden 30 Minuten bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert ; das Pellet wurde vorsichtig freigespült und dann in 3 ml Puffer / 10 g Ausgangsgewicht aufgenommen. Durch Zugabe von 0,2 N KOH wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 erhöht. Die nicht in Lösung gehenden Proteine wurden durch 15 minütige Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde nach Bestimmung des Proteingehaltes (37) in Portionen zu je 500 µl als pH-5 -Fraktion in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Besaßen die verwendeten postmikrosomalen Überstände einen hohen tRNS-Gehalt, so wurden sie vor Präparation der pH -5 -Enzyme zusätzlich über DEAE-Sephadex A 5o chromatografiert und tRNS-frei gemacht (38).
Besonders günstige Ergebnisse hinsichtlich biologischer Aktivität und Haltbarkeit lieferte schließlich die neben den pH-5 -Enzymen verwendete AS - 7o -Fraktion, die ohne Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden konnte (39). Als Ausgangsmaterial diente auch hier der postmikrosomale Überstand. Nach Erniedrigung des pH-Wertes auf 6,5 wurde zunächst durch Zugabe von 17o µg Protaminsulfat/ ml die tRNA ausgefällt und durch 15 minütige Zentrifugation bei 5ooo x g pelletiert. Durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat unter konstantem Rühren im Eis und bei laufender Kontrolle des pH - Wertes wurde der Überstand zu 7o Prozent gesättigt. Die ausfallenden Proteine wurden 15 Minuten bei 27ooo x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem geringen Volumen Puffer + 1o % Glycerin aufgenommen und nach Korrektur des pH - Wertes auf 7,4 in einem Visking-Schlauch 18 h gegen den Extraktionspuffer + 1o% Glycerin dialysiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde er als AS-7o-Fraktion in Portionen zu je 5oo µl in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung aufbewahrt.

Zur Isolierung der Hirn - tRNS verwendeten wir zunächst die von AVITAL und ELSON zur Isolierung bakterieller tRNS angegebene Technik der kalten Phenolextraktion (4o) . Dabei wurden alle Präparationsschritte mit Ausnahme der Desacylierung der tRNS bei 3^{o} C ausgeführt. Außerdem wurde steril gearbeitet um eine Kontamination der Nukleinsäuren durch RNasen möglichst zu vermeiden.Als Ausgangsmaterial diente der postmikrosomale Überstand nach fraktionierter Zentrifugation des Hirngewebes. Diesem wurde zu gleichen Teilen ein Phenolreagenz folgender Zusammensetzung zugegeben: Phenol ,frisch destilliert, 52o ml ,m-Kresol 7o ml , 8-Hydroxychinolin 5oo mg, Aqua bidest. 15o ml. Nach 3o minütigem Rühren wurde Chloroform hinzugefügt (o,1 faches Volumen der eingesetzten Phenolmenge) und erneut 15 Minuten gerührt. Danach wurde die Suspension 6o Minuten bei 12ooo x g abzentrifugiert. Während diese Zentrifugation bei der Präparation von tRNS aus Bakterien und Leber zu einer sauberen 3-Phasentrennung: Phenolphase-Proteinschicht-wässrige Phase führt, erreichten wir bei der Isolierung der Hirn-tRNS im allgemeinen nur eine unvollständige Trennung von Proteinschicht und wässriger Phase. Deshalb wurde zunächst die gut abgegrenzte untere Phenolphase mit einer Pasteur-Pipette ,die durch die Proteinschicht geführt wurde, abgesaugt. Die Protein-Wasser -Phase wurde dann mit einem 2 fachen Volumen Puffer versetzt und 3o Minuten gerührt. Bei der anschließenden Zentrifugation 15 Minuten bei 12ooo x g pelletierten dann die denaturierten Proteine mit Resten des Phenols. Der wässrige die Nukleinsäuren enthaltende Überstand wurde abgehoben. Das Proteinpellet wurde mit Puffer erneut extrahiert, die Überstände wurden vereinigt. Zur Beseitigung von Phenolresten wurden sie mit dem doppelten Volumen Diäthyläther versetzt und

15 Minuten im Schütteltrichter ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde dann von der Ätherphase getrennt und 2o Minuten mit Stickstoff durchgast um Reste von Äther zu beseitigen. Durch Zusatz eines 2,5 fachen Volumens Äthanol-Kaliumazetat (Äthanol 95 % + Kaliumazetat 2 %) wurden dann die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase über Nacht ausgefällt. Durch 15 minütige Zentrifugation bei 12ooo x g wurden die gefällten Nukleinsäuren pelletiert ; die Pellets wurden kurz in Äthanol-Kaliumazetat resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Zur Ablösung der an die tRNS gebundenen Aminosäuren wurden die Nukleinsäure-Pellets dann in 1 ml/g Ausgangsgewicht 2 M TRIS-HCl , pH 8,o, gelöst und 9o Minuten im Wasserbad bei 37^{o} C inkubiert. Nach dieser Desacylierung wurden die Nukleinsäuren erneut mit Äthanol-Kaliumazetat 1 Stunde bei einer Temperatur von - $2o^{o}$ C gefällt und pelletiert. Zur Beseitigung von Verunreinigungen durch Bruchstücke von DNS und rRNS wurden die Pellets anschließend in o,5 ml/g Ausgangsgewicht 2M Lithiumchlorid ,pH 5,o , + o,1 M Kaliumazetat suspendiert und 2o Minuten gerührt. Unter diesen Bedingungen geht die tRNS in Lösung, während die anderen Nukleinsäuren gefällt bleiben und bei erneuter Zentrifugation pelletiert werden. Nach Reextraktion des Pellets wurden die Überstände vereinigt und zur Beseitigung von Lithiumchlorid und niedermolekularen RNS-Bruchstücken 6 x 3o Minuten in Visking -Schläuchen gegen 1 x $1o^{-6}$ M Magnesiumazetat dialysiert. Nach der Dialyse wurde die tRNS mit Äthanol-Kaliumazetat bei - $2o^{o}$ C gefällt , pelletiert und in einem geringen Volumen Puffer aufgenommen.

Die Ausbeute wurde mengenmäßig erfaßt durch die Bestimmung der Absorption bei 26o nm im Spektralphotometer PM Q II.

Zugrunde gelegt wurde dabei folgende Beziehung :

o,5 A_{260nm} tRNS = 25 µg = 1 nMol ;

(mittleres Molekulargewicht der tRNS: 25ooo).

Ein wesentlicher Nachteil der Phenolextraktion von Nukleinsäuren besteht darin, daß ein Teil der tRNS mit den denaturierten Proteinen ausfällt und nicht mehr extrahierbar ist. Deshalb wurde bei einer Reihe der tRNS-Präparationen zur Verbesserung der Ausbeute das Phenol durch Diäthylpyrocarbonat ersetzt (41 - 43). Als Ausgangsmaterial dienten dabei die auf o° C aufgetauten Gehirne , die mit dem 1o fachen Volumen Extraktionspuffer versetzt und homogenisiert wurden. Unmittelbar danach wurden 2o µg Diäthylpyrocarbonat /ml Homogenat hinzugegeben und 5 Minuten unter gelegentlichem Rühren bei 37° C inkubiert. Nach Abkühlen des Homogenats auf 3° C wurde dann zur Beseitigung von Zelltrümmern und Kernen 1o Minuten bei 1ooo x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit o,1 g/ml NaCL versetzt, das durch kurzes Rühren bei 2o° C gelöst wurde. Reste von Mitochondrien und Synaptosomen wurden durch 2o minütige Zentrifugation bei 12ooo x g pelletiert. Mit Äthanol -Kaliumazetat wurden aus dem Überstand die Nukleinsäuren ausgefällt ; die tRNS wurde wie beschrieben desacyliert und extrahiert.

Durch Extraktion der Nukleinsäuren mit Diäthylpyrocarbonat konnte die Ausbeute an tRNS/g Gehirn gesteigert werden; die biologische Aktivität war im Vergleich zu den mit Phenol extrahierten Chargen jedoch geringer. Wir bemühten uns deshalb um eine weitere Verbesserung der Isolierungstechnik. Als besonders günstig erwies sich schließlich die kombinier-

te Extraktion der Nukleinsäuren mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) , Proteinase K und Phenolreagenz (44) : der postmikrosomale Überstand wurde mit 5o µg/ ml Proteinase und mit 5 mg/ ml SDS versetzt und 6o Minuten unter Schütteln bei 25 ^{o} C inkubiert. Dann wurden die Nukleinsäuren in der üblichen Weise mit Phenol extrahiert. Im Gegensatz zu der direkten Extraktion mit Phenolreagenz kommt es bei dieser Methode zu einer scharfen Trennung in 3 Phasen: Phenolphase - dünne Schicht nicht gespaltener, denaturierter Proteine - wässrige Phase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgehoben und von Phenolresten gereinigt. Die Nukleinsäuren wurden pelletiert, die tRNS mit TRIS-HCl desacyliert und mit Lithiumchlorid extrahiert.
Die Reinheit der einzelnen tRNS-Chargen wurde elektrophoretisch in 7,5% igen Polyacrylamid-Gelen geprüft (45).
Der Reinheitsgrad der nach den angegebenen Methoden isolierten tRNS-Spezies war gleich hoch und unterschied sich nicht von der Reinheit käuflicher tRNS Chargen aus E. coli MRE 6oo und Kalbsleber (BOEHRINGER) .

Mitochondrien und Synaptosomen wurden durch Zentrifugation über Saccharose- oder Ficoll-Gradienten aus den Gehirnen isoliert (16 - 18, 46) . Die Gehirne wurden dabei in einem 7 fachen Volumen Extraktionspuffer + o,32 M Saccharose aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Beseitigung von Zelltrümmern und Kernen 15 Minuten bei 1ooo x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem 3 fachen Volumen Puffer reextrahiert ; die Überstände wurden vereinigt. Die mitochondriale Rohfraktion, in der auch die Synaptosomen enthalten sind, wurde durch 2o minütige Zentrifugation bei 12ooo x g aus dem Überstand pelletiert. Das Pellet wurde

in 6 ml/g Ausgangsgewicht Puffer suspendiert, kurz im Glas -Glas-Homogenisator homogenisiert und erneut 2o Minuten bei 12ooo x g zentrifugiert. Die sedimentierte Rohfraktion wurde dann in 3ml/g Ausgangsgewicht Puffer erneut suspendiert und homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend auf einen diskontinuierlichen Saccharose- oder Ficoll-Gradienten aufgetragen.

Je 1o ml des Homogenats wurden auf 1o ml o,8 M Saccharose aufgetragen , die vorher 1o ml 1,2 M Saccharose überschichtet worden war. Nach 2 stündiger Zentrifugation bei 1o5ooo x g (SW - Rotor 3 x 35 ml) waren die Mitochondrien durch die Saccharose pelletiert, während die Synaptosomen die Interphase zwischen o,8 M und 1,2 M Saccharose bildeten und Reste der Myelinscheiden zusammen mit anderen Verunreinigungen an der Grenze zwischen o,32 M und o,8 M Saccharose hängenblieben. Mit einer Pasteur-Pipette wurden die Synaptosomen vorsichtig abgenommen , mit dem 1o fachen Volumen Puffer versetzt und 3o Minuten bei 12ooo x g pelletiert. Die Mitochondrien wurden nach Abheben des Überstandes und vorsichtigem Freispülen der Innenwände der Zentrifugenbecher im einem 1o fachen Volumen Puffer suspendiert, der o,5 % Digitonin enthielt (47) .Nach 15 minütigem Rühren wurden sie ebenfalls 3o Minuten bei 12ooo x g pelletiert.

Die diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten wurden durch Überschichtung von je 4 ml 5% - 7,5 % - 1o % - 13,5 % - 2o % Ficoll in o,32 M Saccharose frisch hergestellt und vor der Verwendung 1 Stunde bei 3^{o} C stehen gelassen. Aufgetragen wurden dann 1o ml Homogenat. Zentrifugiert wurde 2 Stunden bei 1o5ooo x g im Ausschwing-Rotor 3 x 35 ml. Unter diesen Bedingungen pelletierten die Mitochondrien oder blieben an der Grenze zwischen 13,5 % und 2o % Ficoll hängen. Die Syn-

aptosomen bildeten die Interphasen zwischen 7,5 % und 13 % Ficoll, während das Myelin zwischen Puffer und 2 % Ficoll eine deutliche Bande bildete. Mitochondrien und Synaptosomen wurden vorsichtig getrennt gesammelt, mit Puffer verdünnt und pelletiert. Die Pellets wurden dann in einem begrenzten Volumen Puffer aufgenommen. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurden die einzelnen Chargen entweder sofort verwendet oder in Portionen von je 500 µl in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Der Reinheitsgrad der einzelnen Fraktionen wurde elektronenmikroskopisch überprüft (s. S. 36).

Die biologische Aktivität der isolierten Einzelkomponenten des Protein synthetisierenden Apparates wurde untersucht in zellfreien Systemen der Inkorporation markierter Aminosäuren. Ein solches System mit Polysomen enthält in einem Gesamtvolumen von 125 bis 250 µl die nachfolgenden Bestandteile in der angegebenen Konzentration :

TRIS - HCl , pH 7,4 ,	100 mM
Magnesiumazetat	4,5-6 "
KCl	120 "
NaCl	20 "
Dithiotreitol	1 "
ATP	1,5 "
GTP	0,03 "
Phosphokreatin	2 "
Kreatinphosphokinase	25 µg
tRNS	0,5-1 $A_{260\ nm}$
Polysomen	1 -2 "
^{14}C-Proteinhydrolysat (51 mCi/mA C)	0,25 µCi

Enzyme: pH 5 /AS 70 200-400 µg, S 100 600-700 µg Protein

Die biologische Aktivität der isolierten Ribosomen wurde gemessen in zellfreien Systemen, denen synthetische homopolymere Nukleotide als mRNS (Poly U , Poly A) zugesetzt wurden. Im einzelnen wurden die Ribosomen zunächst durch Inkubation mit einem Gemisch von ^{12}C-Aminosäuren (50 nMol von jeder Aminosäure/ml Ansatz) bei 37° C von Resten anhaftender endogener mRNS befreit = "run off-ribosomes" (27). Dann wurde zur Beseitigung ausgefallener Proteine 15 Minuten bei 12000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über Sephadex - G 25 (Säule : 6 x 0,5 cm) chromatografiert, um die nicht markierten Aminosäuren zu entfernen. Das Eluat wurde entweder direkt in die zellfreien Systeme eingesetzt oder 2 Stunden bei 135000 x g zentrifugiert. Die pelletierten Ribosomen wurden dann in einem begrenzten Volumen Puffer aufgenommen und zu den Testansätzen gegeben. Die Magnesium-Konzentration in den ribosomalen Systemen wurde auf 15 mM erhöht, da hierdurch trotz fehlender Initiations-Codons auf der mRNS der Start der Proteinsynthese erzwungen werden kann. Zur Regeneration des ATP dienten 4mM Phosphoenol-Pyruvat und 5 µg Pyruvatkinase. Als Substrat wurden entweder 0,25 µCi ^{14}C-Phenylalanin (59 mCi/mMol) oder 0,25 µCi ^{14}C-Lysin (66 mCi/mMol) eingesetzt. Durch Zugabe von je 50 µg Poly U oder Poly A wurde der Einbau der Aminosäuren in säurefällbares Protein gestartet. Inkubiert wurden die Testansätze im Wasserbad bei 37° C.

Durch die Bestimmung der Radioaktivität im säurefällbaren Protein der Inkubationsgemische wurde die Aktivität der zellfreien Systeme gemessen. Wir verwendeten hierzu die Filterplättchentechnik von MANS und NOVELLI , die bei vergleichenden Vorversuchen gegenüber anderen Methoden (Millipore

-Technik , Präzipitationsmethode) hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Leerwerte die besten Resultate ergab (48) .

Nach definierten Inkubationszeiten wurden dabei mit Eppendorf- oder Konstriktionspipetten Aliquots von 25 - 5o µl aus den Testansätzen entnommen und auf die Filterplättchen (Durchmesser : 2,3 cm) aufgetragen. Nach kurzem Antrocknen im heißen Luftstrom eines Föhns wurden die Filter in 1o % ige eiskalte Trichloressigsäure (TCA) geworfen. Um Proteine und auch beladene tRNS quantitativ auszufällen, wurden die Filter bis zu 2 Stunden in der 1o% igen TCA belassen. Dann wurden sie auf einen Faltenfilter zum Abtropfen gelegt und anschließend in 5 % ige kalte TCA geworfen. Dieser Waschprozess wurde noch zweimal wiederholt, um alles radioaktive nicht präzipitierte Material zu entfernen. Die gefällte tRNS in den Filtern wurde 15 Minuten bei 9o^{o} C in 5% iger TCA hydrolysiert, der Waschprozess in kalter TCA danach zweimal wiederholt. Nach jedem Waschvorgang wurden die Filter auf einem Faltenfilter abgetropft. In einem Gemisch von Äther /Äthanol 5o : 5o wurden mitgefällte Lipide aus den Präzipitaten herausgelöst. Die Filterplättchen wurden schließlich in Szintillationsfläschchen getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einem Toluol-Szintillator im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer bestimmt.

Die gemessenen Aktivitäten wurden entweder in dpm / Testansatz oder mg Polysomen umgerechnet oder in Mol eingebauter Aminosäure/ Mol Ribosomen angegeben. Als Leerwerte dienten gleichzeitig inkubierte Ansätze ohne Ribonukleoproteid-Partikel und komplette Inkubationsgemische,die im Eis belassen wurden. In den zellfreien Systemen mit Ribosomen wurde die

Matrizen-Aktivität der künstlichen mRNS durch Inkubation eines Ansatzes ohne Zusatz des Homopolymers bestimmt.

Unabhängig von der Bestimmung der Aminosäuren inkorporierenden Aktivität der zellfreien Systeme wurde im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen auch die Beladung der spezifischen Hirn-tRNS mit den zugehörigen Aminosäuren gemessen. Im einzelnen wurde die Akzeptor-Funktion der spezifischen tRNS mit den nachfolgenden Aminosäuren untersucht:

$tRNS^{Phe}$: ^{14}C-Phenylalanin (59 mCi/mMol)
$tRNS^{Lys}$: ^{14}C-Lysin (66 mCi/mMol)
$tRNS^{Leu}$: ^{14}C-Leucin (59 mCi/mMol)
$tRNS^{Meth}$: ^{14}C-Methionin (59 mCi/mMol)

Die Standard-Systeme zu Aminoacylierung der tRNS enthielten in einem Gesamtvolumen von 125 - 150 µl die nachfolgenden Komponenten in der angegebenen Konzentration :

TRIS-HCl , pH 7,4 ,	100 mM
Magnesiumazetat	10,5 "
KCl	120 "
NaCl	20 "
Dithiotreitol	1 "
ATP	1,5 "
GTP	0,003"
CTP	0,1 "
Phoshoenol-Pyruvat	4 "
Pyruvatkinase	5 µg
tRNS	0,5-1 A_{260nm}
Enzyme	100 µg Protein
^{14}C-Aminosäure	0,25 µCi

Nach definierten Inkubationszeiten (37° C) wurden Aliquots von 25 - 5o µl aus den Ansätzen entnommen und auf Filterplättchen pipettiert. Die Akzeptor-Aktivität der tRNS wurde dann bestimmt durch die Messung der Radioaktivität in der säurefällbaren Polynukleotidfraktion .
Der Beladungsgrad der tRNS wurde angegeben in pMol Aminosäure/ A_{260nm} tRNS . Als Leerwerte dienten parallel inkubierte Ansätze ohne Enzym sowie komplette Gemische, die nicht inkubiert wurden.

Die Standardsysteme zur Inkorporation der Aminosäuren mit Mitochondrien oder Synaptosomen enthielten in einem Gesamtvolumen von 125 -25o µl folgende Bestandteile :

TRIS - HCl , pH 7,4 ,	33 mM
Magnesiumazetat	4,5 "
KCl	1o "
NaCl	1oo "
Dithiotreitol	1 "
Saccharose	1oo "
Natrium-Pyruvat	2o "
Mitochondrien/Synaptosomen	4oo - 8oo µg Protein.

In einer Reihe von Experimenten wurde zusätzlich eine Reihe verschiedener Substanzen einzeln oder kombiniert zu den Inkubationsansätzen gegeben : α- Ketoglutarat 2o mM , ADP 2 mM , GTP 1 mM . Die Inkubation der Testansätze und der Waschprozess der Filter entsprachen den Systemen mit Polysomen oder Ribosomen.
Als Maß der biologischen Aktivität der mitochondrialen oder synaptosomalen Systeme wurden die dpm/ mg Protein berechnet. Nicht inkubierte komplette Ansatzgemische dienten als Leerwerte.

Zur Isolierung der einzelnen Bestandteile des zellfreien Systems aus Leber, das zur Erfassung organspezifischer Effekte herangezogen wurde, wurden die beschriebenen Präparationstechniken nur geringfügig modifiziert. In den Aminosäuren inkorporierenden Ansätzen mit Leber-Polysomen wurde zur Erzielung optimaler Einbauraten die Magnesium-Konzentration auf 8 mM erhöht.

Die zur Isolierung eines biologisch aktiven zellfreien Systems der Proteinsynthese erforderlichen grundlegenden methodischen Experimente wurden mit E. coli MRE 600 durchgeführt. Die bakteriellen Ribosomen wurden dabei nach der von MATTHAEI und NIRENBERG angegebenen Methode präpariert (5). Die tRNS wurde durch kalte Phenolextraktion aus dem 100000 x g - Überstand gewonnen, der nach 24 stündiger Dialyse auch als Enzymfraktion in die Poly U abhängigen Systeme zur Synthese von Poly-Phenylalanin eingesetzt wurde.

Die statistische Auswertung der erhaltenen experimentellen Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte ($\bar{x}$) und ihrer Standardabweichungen (σ) . Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Ermittlung von P mit dem " t " Test von Student für nicht gepaarte oder gepaarte Werte errechnet .

ERGEBNISSE

1. Der Protein synthetisierende Apparat

a. Polysomen und Ribosomen

Die Ribonukleoproteidpartikel (RNP) wurden aus den Gehirnen neugeborener und erwachsener Tiere beiderlei Geschlechts isoliert. Nach Standardisierung der Präparationstechnik ergab sich in beiden Gruppen eine charakteristische Verteilung der RNP , die in Tabelle 1 wiedergegeben ist .

Tabelle 1 : RNP - Verteilung im Gehirn neugeborener und erwachsener NMRI -Mäuse

Partikel	A_{260}-Einheiten/ g Feuchtgewicht *	
	Neugeborene	Erwachsene
freie Polysomen	12,9 ± 3,7	3,8 ± 1,8
membrangebundene Polysomen	12,7 ± 3,1	5,1 ± 2,4
freie Ribosomen	1,8 ± o,7	6,7 ± 1,4
membrangebundene Ribosomen	1,3 ± o,4	12,6 ± 1,9

* Mittelwerte von 15 getrennten Präparationen jeder Altersgruppe ± Standardabweichung

Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß bei gleicher Gesamtausbeute an RNP in den Gehirnen neugeborener Mäuse der Gehalt an Polysomen fast dreimal so hoch ist wie bei erwachsenen Tieren. Umgekehrt ist die Ausbeute an Ribosomen bei den Erwachsenen sechsfach höher als bei den Neugeborenen. Auch bei der Verteilung der RNP innerhalb der beiden Gruppen finden sich deutliche Unterschiede. In den Gehirnen der neugeborenen Mäuse ist der Gehalt an Polysomen achtmal so hoch wie die Konzentration der Ribosomen; die Anzahl freier und membrangebundener RNP ist dabei gleich:

freie /membrangebundene Polysomen : 1,o

freie /membrangebundene Ribosomen : 1,4.

Bei den erwachsenen Tieren ist die Konzentration der Ribosomen doppelt so hoch wie der Gehalt an Polysomen ;außerdem zeigt sich in der Verteilung eher eine Verschiebung zu Gunsten der membrangebundenen Partikel:

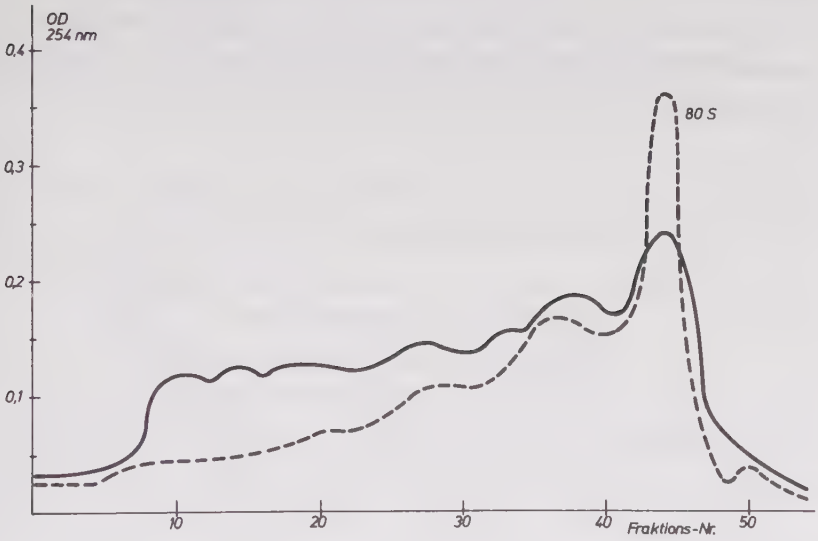
membrangebundene /freie Polysomen : 1,34

membrangebundene /freie Ribosomen : 1,9 .

Zur Charakterisierung der einzelnen Chargen wurden zunächst die Sedimentationsprofile der Polysomen und Ribosomen in der analytischen Ultrazentrifuge SPINCO Modell E mit Schlieren -Optik bestimmt. Die S-Werte wurden dabei nach Bildauswertung im ZEISS-Meßmikroskop in dem Rechner Combitron S der Firma DIEHL mit Standardprogramm ermittelt. Routinemäßig wurde dann später das Polysomenprofil durch Zentrifugation in einem linearen Saccharose-Gradienten bestimmt; dabei wurden nach der Zentrifugation die Zentrifugen-Becher am Boden anpunktiert und der Inhalt fraktioniert. Registriert wurde die optische Dichte der auslaufenden Lösung im Absorptionsmonitor bei 254 nm.

Die Abbildung 1 zeigt die RNP-Profile der Präparationen MH 22 (Erwachsene) und MH 24 (Neugeborene).

Abbildung 1 :
RNP-Profile aus den Gehirnen neugeborener und erwachsener NMRI-Mäuse .



Neugeborene = ——— ; Erwachsene = ----- ; Gradient: linear 15 - 4o % Saccharose ; Zentrifugation OMEGA II 4 h 1o5ooo x g SW-Rotor 3 x 3o ; Fraktionierung und Absorptionsmessung bei 254 nm in der ISCO-Einheit ;Elutionsgeschwindigkeit 3o ml/h; Volumen der einzelnen Fraktionen o,5 ml. Aufgetragen wurden je 12 A_{26o}-Einheiten .

Der unterschiedliche Gehalt der Gehirne neugeborener und erwachsener Tiere an extrahierbaren Polysomen und Ribosomen ist deutlich erkennbar .

b. tRNS

Die tRNS wurde isoliert aus den bei der fraktionierten Zellzentrifugation der Gehirne gewonnenen 1o5ooo x g-Überständen. Nach Standardisierung der Nukleinsäureextraktion durch kombinierte Behandlung mit SDS, Proteinase K und Phenolreagenz ergaben sich deutliche Unterschiede in dem Gehalt der Neugeborenen- und Erwachsenenhirne an extrahierbarer tRNS (Tabelle 2) .

Tabelle 2 : Gehalt des Hirn- und Lebergewebes von NMRI -Mäusen an extrahierbarer tRNS

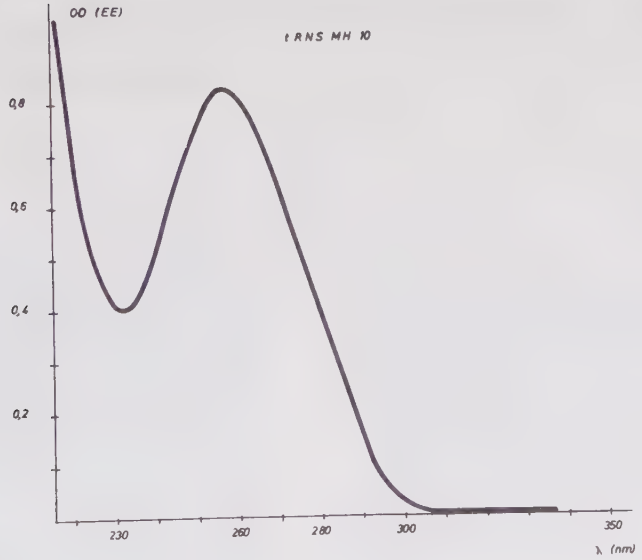
Gewebe	Gehalt an extrahierbarer tRNS (A_{260}-Einheiten / g Feuchtgewicht)	
Neugeborenen-Hirn	8,1 ± 1,8 *	(8)
Erwachsenen -Hirn	3,8 ± o,3	(8)
Leber	6,o ± 1,3	(4)

* Mittelwerte ± Standardabweichungen; ( ) Anzahl der einzelnen Präparationen

Bei der elektrophoretischen Reinheitskontrolle in 7,5 % igen Polyacrylamid-Gelen ergaben sich bei den einzelnen tRNS -Chargen keine wesentlichen Unterschiede. Der Reinheitsgrad entspach dem der käuflichen Kontroll-tRNS aus E. coli MRE 6oo und Kalbsleber (Boehringer). Die aus Tabelle 2 ersichtliche doppelt so hohe Ausbeute bei der Extraktion der Nukleinsäuren

aus den Gehirnen neugeborener Tiere kann deshalb nicht auf eine Verunreinigung dieser Chargen durch DNS-Bruchstücke, rRNS oder Oligonukleotide zurückgeführt werden. Der Gehalt der Leber erwachsener Mäuse an extrahierbarer tRNS ist im Vergleich zum Erwachsenen-Hirn deutlich höher (1,6 fach), erreicht jedoch nicht die Konzentration in den Gehirnen der neugeborenen Tiere. Ein charakteristisches UV-Absorptions-spektrum der tRNS ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Abbildung 3 :
UV-Absorptionsspektrum der tRNS Nr. 1o aus Mäusehirn.



Extraktion mit SDS-Proteinase-Phenol ;Verdünnung 1 : 1oo;
Messung gegen H_2O im SHIMADZU-Photometer UV 2oo .

c. Mitochondrien und Synaptosomen

Mitochondrien und Synaptosomen wurden isoliert aus den bei der fraktionierten Zellzentrifugation gewonnenen Pellets bei 12ooo x g ; in diesen sind außer den genannten Partikeln neben anderen Verunreinigungen vorwiegend Myelinreste enthalten. Die weitere Trennung und Reinigung der Partikel erfolgte über diskontinuierliche Saccharose- oder Ficoll-Gradienten . Beim Vergleich dieser Trennverfahren ergaben sich hinsichtlich Reinheitsgrad und Ausbeute keine wesentlichen Unterschiede. Wegen der einfachereren Handhabung wurden deshalb vorwiegend Saccharose-Gradienten verwendet . Der Gehalt der Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirne an extrahierbaren Mitochondrien und Synaptosomen geht aus Tabelle 3 hervor .

Tabelle 3 : Gehalt des Hirngewebes von NMRI-Mäusen an Mitochondrien und Synaptosomen

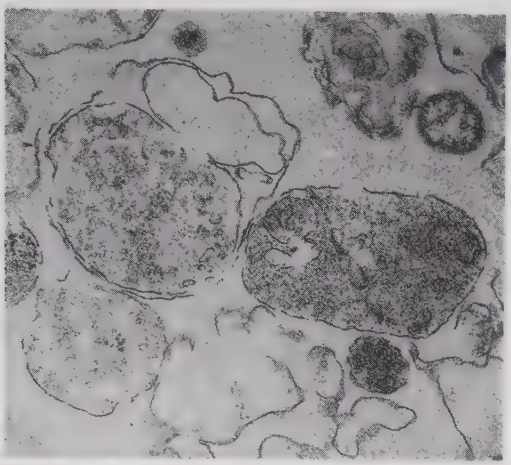
Partikel	Neugeborenen-Hirn	Erwachsenen-Hirn
	(mg Protein/ g Feuchtgewicht)*	
Mitochondrien	2,7 ± o,5 (1o)	3,5 ± 1,8 (7)
Synaptosomen	3,9 ± 1,6 (1o)	5,o ± 2,o (7)

* Mittelwerte ± Standardabweichungen; ( ) Anzahl der einzelnen Präparationen .

Nach Tabelle 3 ist die Ausbeute an Mitochondrien und Synaptosomen bei Isolierung aus Erwachsenen-Hirn etwa 3o % höher als bei den Neugeborenen. Die elektronenmikroskopische Überprüfung der Reinheit der einzelnen Chargen ergab in den Abb. 4 und 5 wiedergegebene Resultate .

Abbildung 4 :

Synaptosomenfraktion Nr. 21 aus erwachsenen NMRI-Mäusen.

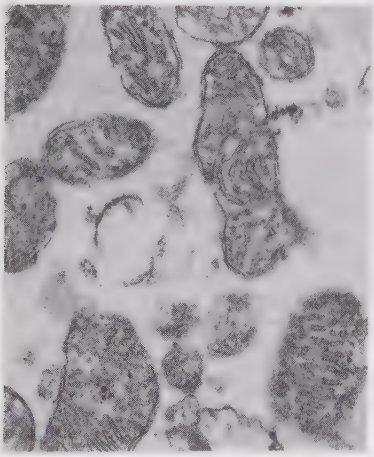


Isolierung nach der Methode von WHITTAKER (16) ; Vergrösserung x 45500 .

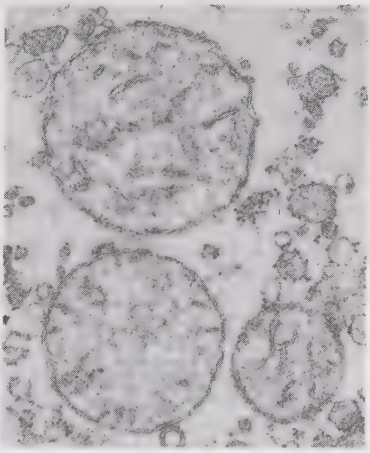
Abbildung 5 :

Mitochondrienfraktionen Nr. 26 aus erwachsenen NMRI-Mäusen.

A : Gehirn



B: Leber



Isolierung nach der Methode von AUTILIO (17) ; Vergrösserung x 45500 .

Aus den Abbildungen 4 und 5 ist deutlich zu ersehen, daß die Isolierung der Mitochondrien und Synaptosomen lediglich in angereicherter Form gelingt. Die ebenfalls erkennbare teilweise Schädigung der Mitochondrienstruktur muß einmal auf den notwendigen Kontakt der Partikel mit den hochmolaren Zuckerlösungen bei der Isolierung, zum anderen sicher auch auf eine bei der Fixierung des Materials auftretende Schädigung zurückgeführt werden. Der Reinheitsgrad der isolierten Fraktionen entspricht jedoch den in der Literatur mitgeteilten Ergebnissen (16 - 17).

d. Enzymfraktionen

Die zur in vitro-Synthese der Proteine erforderlichen löslichen Enzyme wurden zunächst in Form des 105000 x g Überstandes zu den zellfreien Systemen gegeben. Dieser wurde entweder direkt (S-100 "R") oder nach Chromatografie über Sephadex - G 25 (S-100 "C") eingesetzt. In den späteren Experimenten wurden die löslichen Enzyme durch Präparation der pH 5- oder As 70 - Fraktionen weiter angereichert. Synthetasen zur Aminoacylierung der tRNS wurden aus den polysomalen Waschfraktionen isoliert (49). Tabelle 4 zeigt den Gehalt der Gehirne neugeborener und erwachsener Tiere an löslichen Proteinen. Danach ist der Proteingehalt der Fraktionen aus Neugeborenen -Hirn bezogen auf das Organgewicht etwa doppelt so hoch wie bei den erwachsenen Tieren. Lediglich bei der Fraktion der Synthetasen liegt das Verhältnis nur bei 1,35: 1 . Der Proteingehalt der aus Leber isolierten S-100 Fraktionen lag bei 23,5 mg / g für die Rohfraktionen und bei 19,6 mg / g Organgewicht für die chromatografierten Enzyme.

Tabelle 4 : Gehalt der Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirne an extrahierbaren löslichen Proteinen

Enzymfraktion	Neugeborenen-Hirn (mg Protein / g Feuchtgewicht) *		Erwachsenen-Hirn (mg Protein / g Feuchtgewicht) *	
S - 1oo "R"	19,5 ± 2,1	(6)	1o,5 ± 1,9	(6)
S - 1oo "C"	18,1 ± 1,6	(8)	8,7 ± 1,3	(8)
p H 5	4,6 ± 1,4	(4)	2,7 ± o,8	(4)
As 7o	4,1 ± 1,1	(4)	2,o ± o,6	(5)
Synthetasen	2,3 ± o,8	(4)	1,7 ± o,3	(4)

*Mittelwerte ± Standardabweichungen ; ( ) Anzahl der einzelnen Präparationen

2. Eigenschaften der zellfreien Systeme.

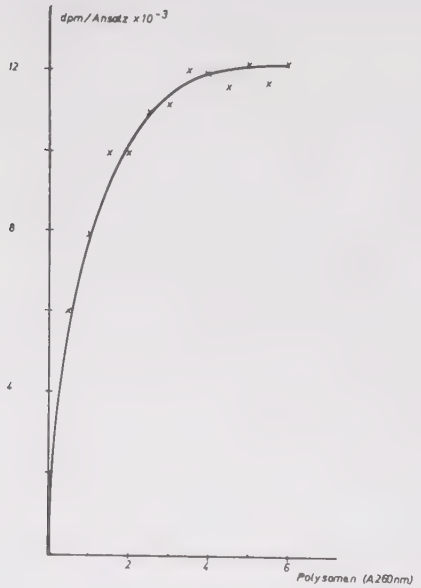
a. Polysomales System.

a.1. Polysomenkonzentration.

Die Einzelkomponenten des Protein synthetisierenden Apparates wurden zur in vitro-Synthese der Hirnproteine in Testgewische mit einem Gesamtvolumen von 125 - 25o µl eingebracht. Um einen optimalen Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein zu erzielen , wurde zunächst die günstigste Konzentration der Polysomen in den Ansätzen ermittelt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 6.

Abbildung 6 :

Abhängigkeit des Einbaus markierter Aminosäuren in zellfreien Systemen aus Mäusehirn von der Polysomen-Konzentration.



Einbaurate angegeben in dpm/Ansatz x $1o^{-3}$; Enzymkonzentration:6oo µg S-1oo Protein; Inkubation 6o min 37° C ; Ansatzvolumen 25o µl.

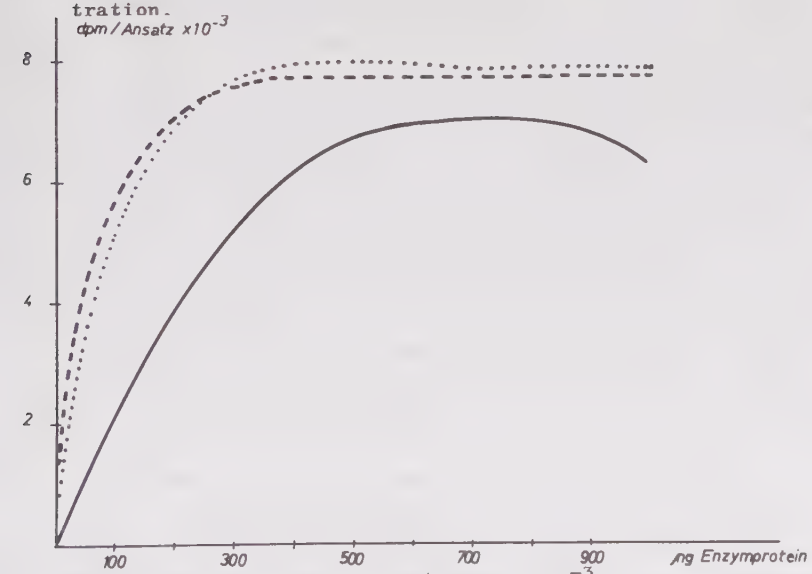
Bei einer Enzymkonzentration von 6oo µg S-1oo Protein führt der Zusatz von 3,5 - 4 A_{26onm} Polysomen zu dem höchsten Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein; eine weitere Erhöhung der Polysomen-Konzentration hat keinen Einfluß mehr auf die Aktivität des zellfreien Systems. Aus Gründen der Materialersparnis wurde die Polysomen-Konzentration im allgemeinen auf 1,5 - 2 A_{26onm}/Ansatz beschränkt, da auch unter diesen Bedingungen ausreichende Einbauraten gemessen werden (8o - 85 % der optimalen Aktivität).

a.2. Enzymkonzentration.

Die bei 2 A_{26onm} Polysomen/25o µl Ansatz günstigsten Konzentrationen an Enzymprotein sind aus Abbildung 7 zu ersehen.

Abbildung 7 :

Abhängigkeit der polysomalen Hirnsysteme von der Enzymkonzentration.



Einbaurate angegeben in dpm/Ansatz x $1o^{-3}$;2 A_{26onm} Polysomen /25o µl Ansatz ; Inkubation 6o min 37° C ;

S-1oo = ———, pH 5 = -----, AS 7o = ♦♦♦♦♦ .

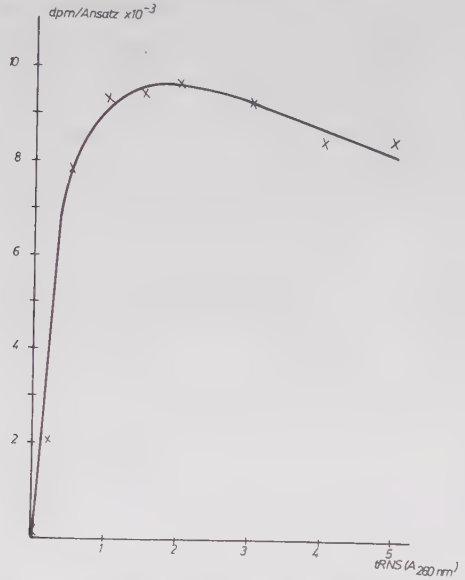
Unter den angegebenen Ansatzbedingungen wird eine optimale Einbauaktivität der polysomalen Systeme durch Zusatz von etwa 6oo µg S-1oo Protein erzielt. Dieses entspricht einem Verhältnis µg Enzymprotein/ µg Polysomen von 3,3 / 1. Bei Verwendung der PH 5- Enzyme oder der AS 7o - Fraktion liegt das optimale Verhältnis Enzymprotein / Polysomen mit 1,7 / 1 deutlich niedriger. Die Einbauaktivität der zellfreien Systeme mit den angereicherten Enzymfraktionen ist dabei gegenüber den Systemen mit S-1oo Proteinen um etwa 1o - 15 % erhöht. Wesentliche Aktivitätsunterschiede zwischen den rohen und über Sephadex- G 25 chromatografierten S-1oo Enzymen fanden sich bei den Hirnsystemen nicht.

a.3. tRNS-Abhängigkeit.

Der Zusatz isolierter Hirn-tRNS zu den zellfreien Systemen mit Polysomen führt zu einer Steigerung der Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein um maximal 2o % . Die Ursache für diese relative Unabhängikeit gegenüber exogener tRNS liegt in dem offenbar hohen Gehalt der Polysomenfraktion an "endogener" , also noch an die Polysomen gebundener und mit diesen sedimentierter tRNS. Durch Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Polysomen-Suspension auf o,5 M kann die gebundene tRNS jedoch abgewaschen werden. Die dann erneut pelletierte Fraktion tRNS-freier Polysomen ("high-low polysomes") ist in ihrer Einbauaktivität vom Zusatz isolierter tRNS zu den zellfreien Systemen abhängig. Diese Abhängigkeit tRNS-freier polysomaler Systeme von der Konzentration zugeführter Hirn-tRNS zeigt Abbildung 8.

Abbildung 8 :

Abhängigkeit der zellfreien Hirnsysteme mit tRNS-freien Polysomen von der tRNS-Konzentration.



Einbauaktivität angegeben in dpm/Ansatz x 10^{-3} ; Ansatzvolumen 250 µl; Polysomen 1,5 A_{260nm}, Enzyme:200 µg pH 5 Protein; Inkubation 60 min 37° C .

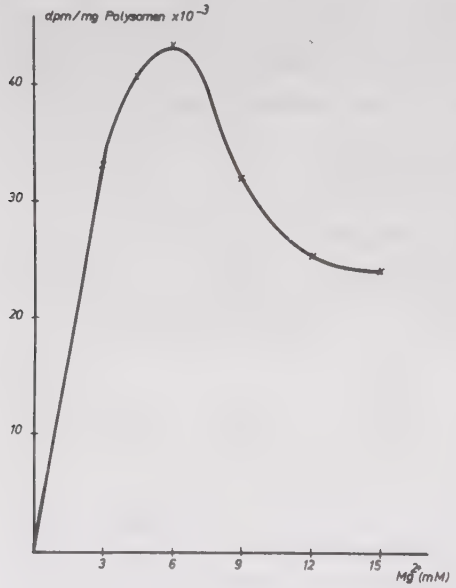
Abbildung 8 ist zu entnehmen, daß bei Zusatz von 1 -1,5A_{260nm} tRNS eine Sättigung des Systems erreicht ist. Durch weitere Erhöhung der tRNS-Konzentration in den Ansätzen ist keine Steigerung der Einbauaktivität mehr zu erreichen.

a.4. Magnesium-Konzentration.

Beim Ablauf der Proteinsynthese haben Mg^{2+}-Ionen eine wesentliche Bedeutung für die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten. Deshalb ist eine Abhängigkeit der zellfreien Systeme von der Mg^{2+}-Konzentration zu erwarten. Das Ergebnis einer entsprechenden Versuchsreihe zeigt Abbildung 9 .

Abbildung 9 :

Aktivität der zellfreien Hirnsysteme mit Polysomen von der Mg^{2+}-Konzentration.



Einbaurate angegeben in dpm/mg Polysomen x $1o^{-3}$; 2 A_{26onm} Polysomen + 677 µg S-1oo Protein / 25o µl Ansatz ; Inkubation 6o min 37° C.

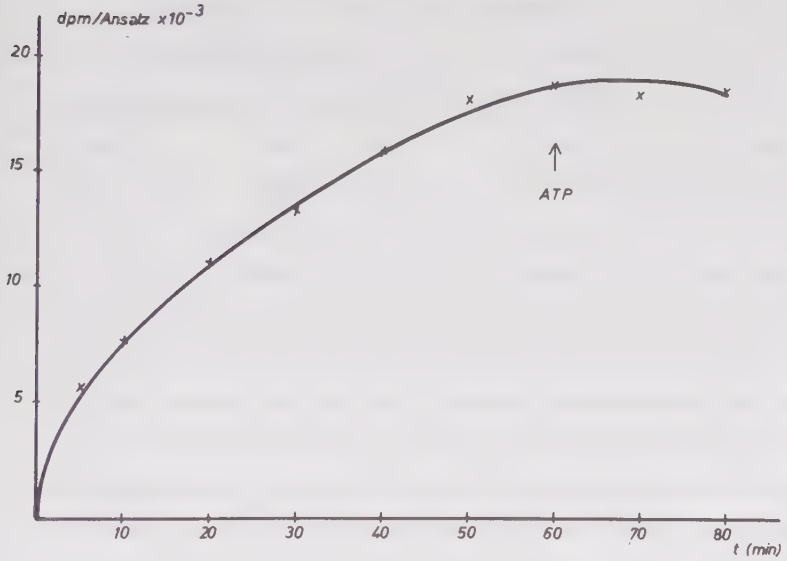
Der Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein ist nach Abbildung 9 bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 4,5 - 6 mM am höchsten. Eine weitere Erhöhung des Mg^{2+} führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aktivität der polysomalen Systeme.

a.5. Inkubationszeit.

Der Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein ist in den zellfreien Systemen zeitabhängig. Ursache dieser Begrenzung sind nicht nur der Verbrauch der vorhandenen energiereichen Phosphate und die Erschöpfung des Energie regenerierenden Systems, sondern offenbar auch limitierende Faktoren der Polysomen- und Enzymfraktion selbst. Die zeitliche Begrenzung der Einbauaktivität polysomaler Systeme geht aus Abbildung 1o hervor.

Abbildung 1o :

Abhängigkeit der Aktivität polysomaler Systeme von der Inkubationsdauer.



Einbaurate angegeben in dpm/Ansatz x $1o^{-3}$; 4 A_{26onm} Polysomen + 9oo µg S-1oo Protein/5oo µl Ansatz; nach 6o min. Zugabe von 1 µMol ATP.

Aus Abbildung 1o ist ersichtlich, daß nach 6o Minuten Inkubationszeit bei 37° C ein Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein nicht mehr erfolgt. Eine Reaktivierung des polysomalen Systems ist dann auch durch Zugabe von ATP nicht mehr zu erzielen.

a. 6. Optimiertes polysomales System.

Nach Ermittlung der günstigsten Bedingungen für die Inkorporation markierter Aminosäuren zeigten die polysomalen Hirnsysteme folgende Charakteristika (Tabelle 5) :

Tabelle 5 : Eigenschaften optimierter zellfreier Systeme mit Polysomen aus Mäusehirn

System	Inkorporation markierter Aminosäuren			
	freie P.		membrangebundene P.	
	(dpm/mg P.)	(%)	(dpm/mg P.)	(%)
komplett	3o743 *	1oo	27423 *	1oo
- tRNS **	23364	76	22795	83
- ATP	2459	8	3522	13
- Polys.	3o6	1	3o5	1

* Medianwerte von 15 Einzelansätzen ; maximale Einbaurate nach 6o min. Inkubation . ** s.S. 4o.

Die Eigenschaften der zellfreien Systeme mit freien und membrangebundenen Partikel sind demnach nicht unterschiedlich. Die Einbauaktivitäten parallel isolierter freier und membrangebundener Polysomen aus dem gleichen Ausgangsmaterial waren bei allen Präparationen gleich mit einer Standardabweichung von ± 12 % .

Auch die tRNS-Abhängigkeit und die Abhängigkeit vom Zusatz energiereicher Phosphate zeigten keine signifikanten Unter-

schiede. In den als Leerwerte dienenden zellfreien Ansätzen ohne Polysomen wurde säurefällbare Radioaktivität in der Größenordnung von 1 % der kompletten Systeme gemessen. Wurden die kompletten zellfreien Systeme nicht inkubiert, dann lag die Einbaurate markierter Aminosäuren in diesen Kontrollansätzen bei 3 - 5 % der inkubierten Testgemische.

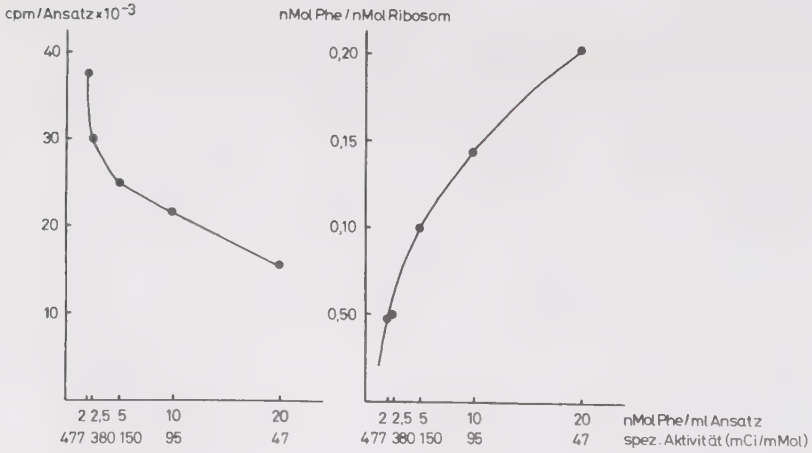
b. Ribosomales System.

Die biologischen Aktivitäten freier und membrangebundener Hirn-Ribosomen wurden in zellfreien Systemen mit künstlichen messenger-RNS gemessen. Die Ribonukleoproteid-Partikel wurden dabei entweder als " run off-ribosomes" eingesetzt oder vor der Inkubation mit der mRNS durch Präinkubation mit einem Gemisch kalter ^{12}C-Aminosäuren von Resten hirneigener mRNS befreit. Zur Optimierung der ribosomalen Systeme wurden den polysomalen Systemen entsprechende Versuchsreihen durchgeführt.

Die günstigste Ribosomen-Konzentration in den Ansätzen liegt bei 2-3 A_{260nm}/250 µl Testgemisch. Bei einer Konzentration von 2 A_{260nm} Ribosomen werden die höchsten Einbauraten markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein durch Zugabe von 700 µg S-100 Protein und 250-300 µg pH 5 - oder AS 70 -Protein erzielt. Dieses entspricht einem Verhältnis mg Ribosomen: S-100 Protein von 1:4,6 , einem Verhältnis mg Ribosomen : mg pH 5- oder AS 70-Protein von 1 : 2 . Der Einbau von Phenylalanin wird am günstigsten durch Zugabe von 50 µg Poly U, der Einbau von Lysin durch Zugabe von 80 µg Poly A zu den Testansätzen gestartet. Im Gegensatz zu den polysomalen Systemen sind die zellfreien Systeme mit Hirn-Ribosomen tRNS - abhängig. Die optimale tRNS-Konzentration liegt bei

2 A_{260nm}/ Ansatz. Das Mg^{2+}-Optimum der ribosomalen Systeme liegt erwartungsgemäß mit 15 x 10^{-3} M sehr hoch, da diese hohe Konzentration eine Anlagerung des künstlichen messengers trotz fehlendem Initiations-Codon an die 40 S-Untereinheit der Ribosomen möglich macht. Inkubation der ribosomalen Systeme bei 37° C führt zu einer Inkorporation der markierten Aminosäuren in säurefällbares Protein über einen Zeitraum von 50 - 60 Minuten. Diese zeitliche Begrenzung kann ebenso wie bei den polysomalen Systemen nicht durch Zugabe von ATP zu den Ansätzen nach diesem Zeitraum aufgehoben werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die günstigste Substratkonzentration in den Ansätzen für den Poly U abhängigen Einbau von Phenylalanin in säurefällbares Protein bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 11 .

Abbildung 11 :
Abhängigkeit des Poly U - Poly Phe Systems von der Substratkonzentration.



A: Einbaurate in cpm/Ansatz x 10^{-3} ; B : Einbau in nMol Phe / nMol Ribosomen ; 0,25 µCi ^{14}C-Phe / Ansatz ; unter der Substratkonzentration die zugehörige spezifische Aktivität (mCi/mMol) ; Inkubation 60 min 37 ^{0} C .

Aus Abbildung 11 ist zu ersehen, daß die Verwendung markierter Aminosäuren mit hoher spezifischer Aktivität zwar hohe Zählraten liefert, daß die Substratkonzentration jedoch dabei unterhalb des Sättigungsbereichs liegt. Bei allen nachfolgenden Experimenten wurden deshalb die spezifischen Aktivitäten der markierten Substanzen auf 50 - 60 mCi/ mMol erniedrigt. Tabelle 6 zeigt die Charakteristika optimierter Poly U abhängiger Polyphenylalanin synthetisierender Systeme.

Tabelle 6 : Eigenschaften der optimierten Poly U - Poly Phe Systeme aus Mäusehirn

System	Polyphenylalanin - Synthese			
	freie Ribosomen		membrangeb. Ribosomen	
	(nMol Phe/nMol R.)	(%)	(nMol Phe/nMol R.)	(%)
komplett	3,70 *	100	2,03 *	100
- tRNS	0,74	20	0,67	33
- ATP	0,30	8	0,24	12
- Poly U	0,22	6	0,28	14
- Ribosomen		2		1

* Medianwerte von 10 Einzelansätzen ; maximale Einbauraten nach 60 min. Inkubation .

Nach Tabelle 6 ist die Poly U abhängige Synthese von Poly -Phenylalanin in den zellfreien Systemen mit Ribosomen aus Mäusehirn sehr hoch; die biologische Aktivität der freien und membrangebundenen Partikel ist jedoch unterschiedlich. Die geringere Syntheserate in den Systemen mit membrangebundenen Ribosomen ist dabei wahrscheinlich auf die beobachtete stärkere Verunreinigung dieser Fraktion mit Proteinen zurückzuführen, die an die membrangebundenen Partikel assoziert sind und mit diesen bei der Isolierung sedimentieren. Für den geringeren Reinheitsgrad der membrangebundenen Ribosomen spricht auch die geringere Abhängigkeit dieser Systeme von der Zufuhr der tRNS, die auch auf eine Assoziation "endogener" tRNS schließen läßt. In den als Leerwerte dienenden zellfreien Ansätzen ohne Ribosomen liegt der Prozentsatz in säurefällbares Protein eingebauter Radioaktivität bei 1 - 2 % der gleichzeitig inkubierten kompletten Systeme .

c. Akzeptorfunktion der Hirn-tRNS.

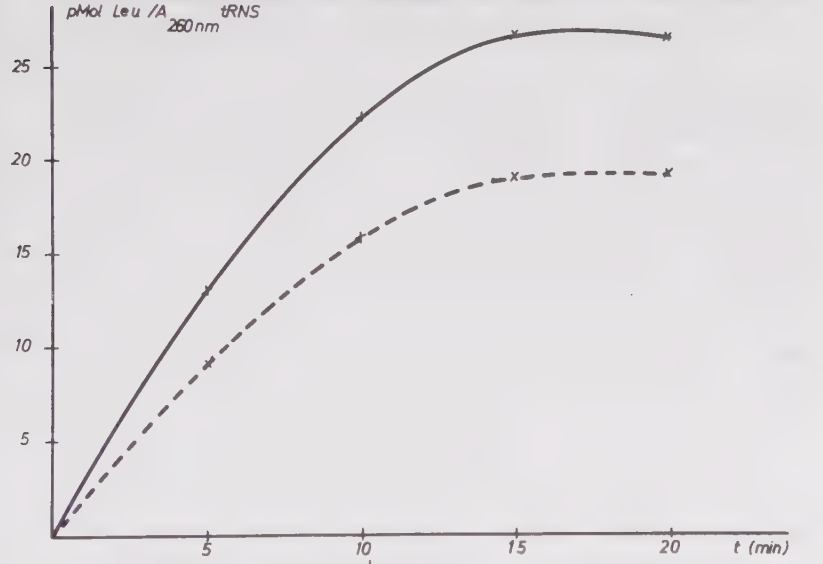
Der Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den Systemen mit Polysomen und Ribosomen läßt eine Aussage über die biologische Aktivität der Hirn-tRNS zu, da auch die zellfreie Synthese der Hirnproteine an eine intakte Akzeptor- und Transferfunktion der tRNS gebunden ist. Die der Initiationsphase der Proteinsynthese vorausgehende Beladung der tRNS (Akzeptorfunktion) kann aber in einem geeigneten System auch selektiv gemessen werden (Standard -System der Aminoacylierung). Im einzelnen wurde die Akzeptorfunktion der spezifischen tRNS für die Aminosäuren Phenylalanin, Lysin, Leucin und Methionin in dem aus Gehirn isolierten tRNS-Gemisch untersucht. Zur Optimierung dieser Beladungs-Systeme wurden zunächst die günstigsten Ansatzkonzentrationen von tRNS und Enzymproteinen ermittelt.

Die optimale tRNS-Konzentration liegt bei 1 A_{260nm} / 250 µl Ansatz. Die für diese tRNS-Konzentration günstigste Enzymkonzentration beträgt bei allen geprüften tRNS 600 - 800 µg S-100 Protein, bei Verwendung der aus der polysomalen Waschfraktion isolierten Synthetasen 100 µg Protein. Inkubation der Testansätze bei 37° C führt zu einer Beladung der tRNS über den Zeitraum von maximal 15 Minuten ; Zugabe von ATP (0,5 mM) führt nicht zu einer Reaktivierung des Beladungssystems.

Durch Zugabe von CTP zu den zellfreien Systemen wird die Beladung der spezifischen tRNS deutlich gesteigert. Die Wirkung von CTP auf die Akzeptorfunktion der $tRNS^{Leu}$ ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

Abbildung 12 :

Einfluß von CTP auf die Beladung der $tRNS^{Leu}$ aus Mäusehirn.



CTP-Konzentration 1 x 10^{-4} M; 1A_{260nm} + 700 µg S-100 Protein /250 µl Ansatz; Beladung angegeben in pMol Leucin/A_{260nm} tRNS; Kontrolle = ----- ; + CTP = ————.

Abbildung 12 ist zu entnehmen, daß die Aktivität des Beladungs-Systems für die $tRNS^{Leu}$ durch CTP in der angegebenen Konzentration um 4o % gegenüber dem System ohne CTP gesteigert ist.

Die Beladung der tRNS verläuft in 2 Schritten. Zunächst kommt es durch Kontakt der ebenfalls spezifischen Synthetasen mit den zugehörigen Aminosäuren zur Bildung eines Aminoacyl-AMP Komplexes. Durch direkte Bindung der spezifischen tRNS an den Enzym-Aminoacyl-AMP Komplex wird dann die tRNS beladen. Die Bildung des Aminoacyl-AMP Komplexes ist abhängig von der Konzentration des Mg^{2+} , ATP und CTP in den in vitro Systemen. Deshalb wurden für jede der geprüften Aminosäuren die optimalen Quotienten Mg^{2+}/ATP und Mg^{2+}/CTP ermittelt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 7 .

Tabelle 7 : Mg^{2+}/ATP und Mg^{2+}/CTP-Optima der zellfreien Beladungs-Systeme für tRNS aus Mäusehirn.

AMINOSÄURE	Mg^{2+}/ATP	Mg^{2+}/CTP
Phenylalanin	6,7	5o
Lysin	1o,o	1oo
Leucin	7-14	5o-1oo
Methionin	4	6o

1 A_{26onm} tRNS + 1oo µg Synthetasen-Protein/25o µl Ansatz; Inkubation 15 min. 37° C .

Nach Tabelle 7 sind die Beladungsoptima für die geprüften tRNS sehr unterschiedlich, ein Ergebnis, das als Hinweis auf die Heterogenität der Synthetasen-Population gedeutet werden kann. Die in den optimierten Systemen ermittelten Beladungsgrade der Hirn-tRNS sind im Vergleich zu der Akzeptoraktivität ebenfalls isolierter tRNS aus Leber in Tabelle 8 zusammengefaßt .

Tabelle 8 : Akzeptoraktivität der tRNS aus Mäusehirn und Mäuseleber .

	Akzeptoraktivität	
	Hirn-tRNS (pMol Aminosäure/A_{260}-Einheit)	Leber-tRNS
$tRNS^{Phe}$	33,6 ± 1,1* (5)	19,2
$tRNS^{Lys}$	28,9 ± 0,8 (5)	27,2
$tRNS^{Leu}$	46,9 ± 5,0 (5)	35,5
$tRNS^{Met}$	22,9 ± 2,2 (6)	18,7

* Mittelwerte ± Standardabweichungen ; ( ) Anzahl der einzelnen Experimente mit verschiedenen tRNS-Chargen ; angegeben die Endbeladung nach 15 min. Inkubation .
Gleichzeitig inkubierte Ansätze ohne Enzym dienten als Leerwerte; diese lagen im allgemeinen nicht über 2 % der kompletten Beladungsansätze. Die Einbauraten der Systeme ohne tRNS schwankten bei der Verwendung von S-100 Enzymen zwischen 9 und 13 % der kompletten Ansätze und wurden als Maß für den Gehalt dieser Enzymfraktionen an "endogener" tRNS gewertet . Bei Verwendung der tRNS - freien

Synthetasen-Fraktion betrug die im säurefällbaren Material gemessene Radioaktivität der Ansätze ohne tRNS dagegen 1 -3 % der Einbauraten kompletter Beladungssysteme. Aus Tabelle 8 ist zu ersehen, daß bei Beladung mit homologen Enzymen die Akzeptorfunktionen der tRNS aus Hirn und Leber keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Lediglich die Beladung der Leber-tRNS mit Phenylalanin ist erheblich niedriger als bei der Hirn-tRNS. Dieses kann entweder Folge einer geringeren Aktivität der spezifischen Synthetase oder aber eines niedrigeren Gehaltes an spezifischer $tRNS^{Phe}$ in dem tRNS-Gemisch aus Mäuseleber sein.

d. Mitochondriales System.

Zur Optimierung des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein durch das autonome mitochondriale System der Proteinsynthese in vitro wurden zunächst die günstigsten Konzentrationen der Einzelkomponenten des zellfreien Systems ermittelt. Die optimale Mitochondrien-Konzentration liegt bei 600 - 800 µg Protein/250 µl ; die höchsten Einbauraten werden gemessen bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 4 - 6 x 10^{-3} M. Die Inkorporation der Aminosäuren ist unabhängig von der Zufuhr energiereicher Phosphate ; Zugabe des bei den polysomalen Systemen üblichen Energie-Puffers führt zu einer Hemmung der Einbauaktivität des zellfreien Systems um 10 -14 % . Durch Zusatz von Natrium-Pyruvat (2 x 10^{-2} M) wird der Einbau markierter Aminosäuren jedoch um 50 % gesteigert. ADP (2 x 10^{-3} M) hat keinen Einfluß auf die mitochondrialen Systeme, Zugabe von α- Ketoglutarat hemmt die Einbauaktivität (2 x 10^{-2} M : 70 % Hemmung) . Inkubation der mitochondrialen Ansätze bei 37° C führt zu einem Einbau in säurefällbares Protein über den Zeitraum von 80 Minuten. Die

Charakteristika optimierter Aminosäuren inkorporierender Systeme mit Hirn-Mitochondrien sind im Vergleich zu der Aktivität mitochondrialer Leber-Systeme in Tabelle 9 zusammengefaßt .

Tabelle 9 : Eigenschaften optimierter mitochondrialer Systeme aus Mäusehirn und Mäuseleber

System	Einbaurate markierter Aminosäuren (dpm / mg mitochondriales Protein)			
	Hirn	(%)	Leber	(%)
komplett	2780 *	100	2190	100
-Na-Pyruvat	1195	43	700	32
- Mitochondrien		6		4

* Medianwert von 10 einzelnen Mitochondrien - Chargen ; maximale Einbaurate nach 80 min. Inkubation .

Die in Tabelle 9 angegebenen Einbauraten entsprechen den biologischen Aktivitäten frischer Chargen. Wesentliche Unterschiede in der Einbauaktivität der Mitochondrien aus Hirn und Leber finden sich dabei nicht. Aufbewahrung der Mitochondrien in flüssigem Stickstoff führte zu einer Aktivitätseinbuße auf 50 - 40 Prozent der frischen Chargen und erwies sich somit als unmöglich. Als Leerwert diente die säurefällbare Radioaktivität in parallel inkubierten Ansätzen ohne Mitochondrien .

e. Synaptosomales System.

Die Fraktion der Synaptosomen besteht aus den präsynaptischen Nervenendigungen, die durch die Scherkräfte bei der Homogenisation des Gehirngewebes von Axonen und postsynaptischen Verbindungen getrennt werden. Sie bestehen aus dem synaptosomalen Cytoplasma, synaptischen Vesikeln, der synaptosomalen Membran und den synaptischen Mitochondrien. Damit ist die Synthese synaptischer Proteine zum Teil sicher Leistung des autonomen mitochondrialen Apparates. Ähnliche Charakteristika zellfreier mitochondrialer und synaptosomaler Systeme sind zu erwarten.

Bei einer Synaptosomen-Konzentration von 600 - 800 µg Protein /250 µl Ansatz findet sich der höchste Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein. Das Mg^{2+} - Optimum liegt bei $4{,}5 \times 10^{-3}$ M. Natrium-Pyruvat stimuliert die Einbauaktivität des Systems um 19 % (2×10^{-2} M) , α-Ketoglutarat (2×10^{-2} M) hemmt die Inkorporation markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein um 20 - 40 % . ADP hat keinen Einfluß auf die Aktivität der synaptosomalen Systeme. Zusatz von ATP ($1{,}5 \times 10^{-3}$ M) hat eine Steigerung der Einbaurate um 14 % zur Folge. Inkubation bei 37 ^{o} C führt zum Einbau markierter Aminosäuren über einen Zeitraum von 70 - 80 Minuten.

Die Eigenschaften des zellfreien Systems mit Synaptosomen sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Einfrieren der einzelnen Chargen in flüssigem Stickstoff hatte einen Aktivitätsverlust von etwa 50 % zur Folge. Als Leerwert diente die säurefällbare Radioaktivität in gleichzeitig inkubierten Ansätzen ohne Synaptosomen . Die Leerwerte lagen bei den einzelnen Ansätzen jeweils zwischen 4 und 9 % der Aktivität der kompletten Systeme.

Tabelle 1o : Eigenschaften optimierter synaptosomaler Systeme aus Mäusehirn

System	Einbaurate markierter Aminosäuren (dpm/ mg synaptosomales Protein)	(%)
komplett	2764 *	1oo
- ATP	2377	86
- Na-Pyruvat	2239	81
- Synaptosomen		8

* Medianwert von 1o einzelnen Synaptosomen-Chargen ; maximale Einbaurate nach 8o min. Inkubation .

3. Spezifität der Akzeptorfunktion der Hirn-tRNS

Die Erkennung der spezifischen tRNS-Moleküle durch die passende Synthetase ermöglicht die Übertragung der aktivierten Aminosäure auf die tRNS durch Bildung eines Komplexes Aminoacyl-AMP-Enzym-tRNS . Die Auswahl der tRNS erfolgt dabei durch Wechselwirkung zwischen der Synthetase und dem Basen -Triplett des Aminosäure-Stammes der tRNS , das unmittelbar an das CCA-Ende der tRNS angrenzt . Dieses Triplett wird als sekundärer genetischer Code bezeichnet (5o - 52) .

Da bei Isolierung aus dem Gehirn erwachsener Tiere die Ausbeute an tRNS mit 3,8 A_{26o} /g Organgewicht niedrig ist, wurde die Akzeptorfunktion heterologer tRNS-Spezies in den Beladungssystemen mit Hirn-Synthetasen untersucht . Dabei sollte geprüft werden , ob in den zellfreien Systemen die homologe Hirn-tRNS durch spezies- oder organheterologe tRNS-Chargen ersetzt werden kann . Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 11 wiedergegeben .

Tabelle 11 : Beladung heterologer tRNS durch Synthetasen aus Mäusehirn

tRNS aus :	Akzeptoraktivität			
	$tRNS^{Leu}$		$tRNS^{Phe}$	
	(pMol Aminosäure/A_{26o}-Einheit tRNS) *			
Mäusehirn	49,4	(1oo)	35,6	(1oo)
Mäuseleber	22,2	(45)	2o,6	(58)
Kalbsleber	48,7	(98)		
Hefe	18,4	(37)		
E. coli	32,9	(6o)		

* Mittelwerte aus 3 Experimenten mit verschiedenen tRNS-Chargen und Enzymfraktionen ; angegeben die Endbeladung nach 15 min. Inkubation .

Nach Tabelle 11 ist die Beladung der geprüften tRNS - Spezies durch Hirn-Synthetasen unterschiedlich. Den höchsten Beladungsgrad zeigt die Hirn-tRNS. Dagegen wird die organ-heterologe Leber-tRNS auffällig gering aminoacyliert. Dieses könnte auf eine gewisse Organspezifität der Beladungsreaktion hinweisen . Die Akzeptoraktivität der tRNS aus Hefe und E. coli ist in den Beladungsansätzen mit Hirnenzymen so niedrig, daß eine Verwendung dieser tRNS-Spezies in den zellfreien Hirn-Systemen nicht in Frage kommen dürfte. Die Aminoacylierung der Kalbsleber-tRNS entspricht dagegen dem Beladungsgrad der geprüften Hirn-tRNS . Da zumindestens in den spezies-heterologen Beladungs-Systemen ein Verlust der Beladungsspezifität der Hirn-Synthetasen nicht auszuschließen ist, muß dieses Ergebnis jedoch mit Vorsicht interpretiert werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung heterologer tRNS in den zellfreien Hirnsystemen verzichtet .

4. Einfluß von Inhibitoren der Proteinsynthese auf die zellfreien Systeme.

Die am Ribosom stattfindende Übertragung der genetischen Information von der mRNS auf die Sequenz der Aminosäuren ist eine komplexe Folge einzelner Reaktionsschritte. Diese können in zum Teil sehr spezifischer Weise durch inhibitorische Substanzen beeinflußt werden. Inhibitoren der Proteinsynthese haben dabei nicht nur eine Bedeutung als Antibiotica oder Chemotherapeutica, sondern können auch als Werkzeug zur Charakterisierung einzelner Schritte im Ablauf der Proteinsynthese verwendet werden. Wir untersuchten deshalb die Wirkung von Puromycin, Cycloheximid, Chloramphenicol und Tetracyclin auf die zellfreien Hirnsysteme.

Puromycin ist strukturell und metabolisch ein Analogon des Aminoacyl-Adenosin-Endes der tRNS. Mit der tRNS konkurrierend lagert es sich an die große Untereinheit des Ribosoms an und wird durch Bindung zwischen der Carboxyl-Gruppe des Peptids und der NH_2 - Gruppe der Puromycin-Seitenkette in die wachsende Peptidkette eingebaut. Dadurch kommt es zum sofortigen Abbruch der Proteinsynthese und zur Freisetzung von Peptidyl-Puromycin sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten (53,54). Cycloheximid wirkt nur am Ribosom von kernhaltigen Zellen. Hier hemmt es Initiation und Elongation der Proteinsynthese. Da durch Blockierung des Faktors EF II (Aminoacyl-Transferase II) das Entlanggleiten des Ribosoms an der mRNS um jeweils ein Basen-Triplett unterbunden wird, werden die Polysomen "eingefroren" (55,56). Chloramphenicol bindet sich spezifisch an die große Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Durch Hemmung der Peptidyl-Transferase verhindert es die Peptidbindung zwischen der Aminoacyl-tRNS am Eingang und der Peptidyl-tRNS am Ausgang des Ribosoms. Eine Hemmung der

mitochondrialen Proteinsynthese wird ebenfalls beschrieben (57-59) . Tetracycline hemmen die bakterielle Proteinsynthes vorwiegend durch Blockierung der Bindung der aminoacylierten tRNS an die mRNS , die Funktion der Mitochondrien wird durch diese Substanzen jedoch ebenfalls beeinflußt (6o-61),was ihre prokaryotische Organisation beweist. Aufgrund ihrer Wirkungsspezifität sollte der Einsatz der genannten Inhibitoren in die zellfreien Systeme aus Mäusehirn einmal eine Differenzierung zwischen mitochondrialer und polysomaler Proteinsynthese ermöglichen. Zum anderen ist ein Hinweis auf die Natur des Protein synthetisierenden Apparates in den Synaptosomen zu erwarten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 12 zusammengefaßt . Zum Vergleich wurde ein zellfreies Poly U abhängiges Polyphenylalanin synthetisierendes System aus E. coli herangezogen .

Tabelle 12 : Einfluß von Inhibitoren der Proteinsynthese auf die zellfreien Hirnsysteme

System	% Hemmung (Kontrollen = o) *			
	Puromycin	Cycloheximid	Chloramph.	OTC
Polysomen	75 ± 2	78 ± 5	o	23 ± 2
Mitochondrien	48 ± 8	5 ± 3	39 ± 14	41 ± 5
Synaptosomen	2o ± 6	4 ± 9	16 ± 5	17 ± 8
E. coli	82 ± 6	7 ± 3	62 ± 9	68 ± 4

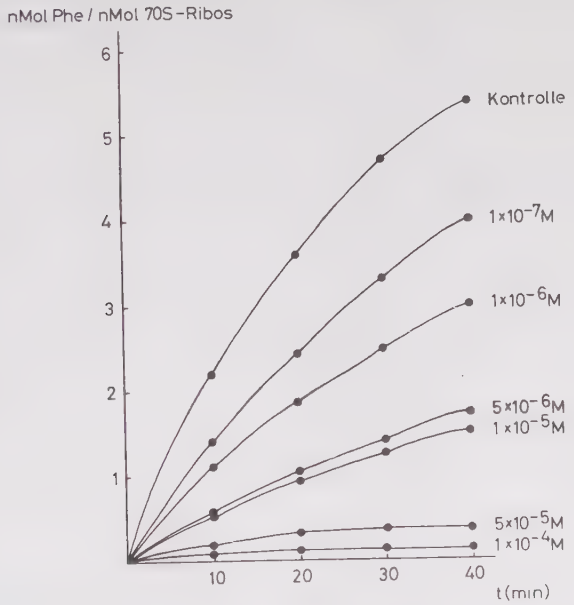
* Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten ± Standardabweichungen ; Konzentration der Inhibitoren in den Hirnsystemen 1oo µM , in dem System aus E. coli 5 µM ; OTC = Oxytetracyclin

Nach Tabelle 12 führen Cycloheximid und Puromycin erwartungsgemäß zu einer massiven Hemmung der Inkorporation markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den zellfreien Systemen mit Polysomen aus Mäusehirn. Chloramphenicol hat dagegen keinen Einfluß auf die polysomale Proteinsynthese, die jedoch überraschend durch Oxy-Tetracyclin um 23% gehemmt wird. Die Aktivität der mitochondrialen Systeme wird nicht nur durch Puromycin, sondern auch durch Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin deutlich gehemmt, während die Zugabe von Cycloheximid keinen signifikanten Einfluß auf die Inkorporation der Aminosäuren hat. Die Hemmwirkung von Puromycin, Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin auf die synaptosomalen Systeme ist deutlich geringer als ihr Einfluß auf die mitochondriale Inkorporation der Aminosäuren. Durch Cycloheximid wird auch die synaptosomale Proteinsynthese nicht beeinflußt. Die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren der Proteinsynthese ist bei dem bakteriellen System aus E. coli MRE 6oo erheblich höher als in den zellfreien Systemen aus Mäusehirn. Puromycin hemmt bereits bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M die Poly U abhängige Synthese von Poly-Phenylalanin um 82 % ; Cycloheximid beeinflußt den bakteriellen Apparat der Proteinsynthese dagegen nicht. Die bei bakteriellen Infektionen vielfach als Antibiotica eingesetzten Inhibitoren Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin zeigen deutliche Hemmeffekte. Die Konzentrationsabhängigkeit dieser Hemmwirkung auf das bakterielle System wurde für Oxy-Tetracyclin gemessen und ist in Abbildung 13 wiedergegeben.
Danach wird bereits bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M Oxy-Tetracyclin in den in vitro-Ansätzen die Aktivität des Protein synthetisierenden Apparates aus E. coli um 35 % ge-

hemmt.

In Hinsicht auf die Empfindlichkeit gegenüber den geprüften Inhibitoren der Proteinsynthese verhält das mitochondriale System aus Mäusehirn sich ähnlich wie das zellfreie System aus E. coli. Auch das synaptosomale System wird von den gleichen Substanzen inhibiert, der Hemmeffekt ist jedoch bei gleicher Konzentration deutlich geringer als bei der Inkorporation der Aminosäuren mit Mitochondrien.

Abbildung 13:
Einfluß von Oxy-Tetracyclin auf das Poly U Poly Phe-System aus E. coli MRE 600 .



Einbaurate angegeben in nMol Phe/nMol Ribosomen; 30 µg Poly U, 4 A_{260nm} Ribosomen + 600 µg S-100 Protein/250 µl Ansatz; Inkubation 37° C ;Einzelheiten unter Methoden.

5. Eigenschaften der zellfreien Systeme aus Neugeborenen - Hirn

Während der Hirnentwicklung kommt es zu erheblichen Veränderungen im Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine . Zahlreiche Untersucher weisen dabei auf eine Abnahme der Aktivität des Protein synthetisierenden Apparates hin (62-65). Zurückgeführt wird diese Aktivitätseinbuße auf die Änderung eines intrazellulären Faktors, der entweder den Ribosomen, oder der Fraktion löslicher Enzyme, oder auch diesen Komponenten Protein synthetisierender Systeme gemeinsam zugeordnet wird (66 - 68) .

Die bisherigen Experimente wurden , wenn nicht besonders gekennzeichnet, mit zellfreien Systemen aus Hirngewebe erwachsener Tiere durchgeführt. In einer weiteren Versuchsreihe prüften wir jedoch vergleichend die Aktivität der Neugeborenen - Systeme (Tabelle 13) .

Tabelle 13 : Aktivität der zellfreien Systeme aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn

System	Einbau markierter Aminosäuren *			
	Neugeborenen-Hirn (dpm/mg Protein)	%	Erwachsenen-Hirn (dpm/mg Protein)	%
Polysomen	111366 ± 17846	179 +	62049 ± 15243	100
Mitochondrien	7105 ± 1243	255 +	2781 ± 213	100
Synaptosomen	1486 ± 77	54 +	2764 ± 235	100

* Mittelwerte aus mindestens 10 Experimenten ± Standardabweichungen ; maximale Einbauraten nach 60 min. Inkubation ;

+ $P < 0{,}01$. Leerwerte s. Tab. 5 .

Nach Tabelle 13 ist die Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den zellfreien Systemen mit Polysomen und Mitochondrien aus Neugeborenen-Hirn deutlich erhöht, während der Einbau in synaptosomales Protein fast um die Hälfte niedriger ist als in den Erwachsenen-Systemen.

Die gesteigerte Einbaurate markierter Aminosäuren in den zellfreien Systemen mit Polysomen und Mitochondrien aus Neugeborenen-Hirn kann das Ergebnis einer Änderung der Eigenschaften einer oder aber mehrerer Komponenten dieser Systeme sein. Zur Klärung dieser Frage untersuchten wir zunächst die Akzeptorfunktion der Neugeborenen-tRNS (Tabelle 14) .

Tabelle 14 : Akzeptoraktivität der tRNS aus Neugeborenen - und Erwachsenen-Hirn

	Akzeptoraktivität der tRNS * (pMol Aminosäure / A_{260}-Einheit tRNS)		
	Neugeborenen-Hirn		Erwachsenen-Hirn
$tRNS^{Phe}$	41,9 ± 1,4	(125) +	33,6 ± 1,1
$tRNS^{Lys}$	37,4 ± 1,5	(129) +	28,9 ± 0,8
$tRNS^{Leu}$	62,8 ± 1,5	(134) +	46,9 ± 5,0
$tRNS^{Met}$	52,7 ± 4,8	(230) +	22,9 ± 2,2

* Mittelwerte aus mindestens 5 Experimenten ± Standardabweichungen ; ( ) % der Erwachsenen-Kontrollen ; angegeben die Endbeladung nach 15 min. Inkubation ;

+ $P < 0,01$.

Die geprüften $tRNS^{Phe}$, $tRNS^{Leu}$ und $tRNS^{Lys}$ sind also in den zellfreien Systemen aus neugeborenen Mäusen um 25 bis 34 Prozent höher beladbar als in den Systemen aus erwachsenen Tieren. Die Akzeptoraktivität der $tRNS^{Meth}$ ist dagegen auf mehr als das Doppelte der Kontroll-tRNS gesteigert. Die gemessene Beladung der $tRNS^{Meth}$ spiegelt zwar die biologischen Aktivitäten der $tRNS_F^{Meth}$ und $tRNS_M^{Meth}$ wieder, ein Zusammenhang dieser auffallend hohen Beladbarkeit der spezifischen Neugeborenen-tRNS mit der Initiator-Funktion der $tRNS_F^{Meth}$ ist jedoch naheliegend.

Die erhöhte Aminoacylierung der Neugeborenen-tRNS kann sowohl Folge einer geänderten Akzeptorfunktion der tRNS selbst, als auch Ausdruck einer gesteigerten Aktivität der beladenden Enzyme sein. Wir untersuchten deshalb in einem Kreuzexperiment die Beladung der Neugeborenen-tRNS und Erwachsenen-tRNS mit Synthetasen aus neugeborenen und erwachsenen Tieren. Das Ergebnis ist in Tabelle 15 wiedergegeben. Bei allen geprüften tRNS ist der Beladungsgrad der Neugeborenen - Moleküle höher, wenn die beladenden Enzyme aus dem Gehirn erwachsener Tiere verwendet werden. Umgekehrt sinkt die Beladung der Erwachsenen-tRNS bei Einsatz der Neugeborenen-Enzyme ab. Danach scheint die Aktivität der Synthetasen-Fraktion aus dem Gehirn der erwachsenen Mäuse eher höher zu sein als bei den neugeborenen Tieren .

Tabelle 15 : Beladung der tRNS aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn mit Synthetasen aus Hirngewebe unterschiedlich alter Tiere

Ansatz mit	Aminoacylierung (als % der Kontrollen mit tRNS und Enzymen gleichen Alters)			
	$tRNS^{Phe}$	$tRNS^{Lys}$	$tRNS^{Leu}$	$tRNS^{Met}$
Neugeborenen-tRNS + Erwachsenen-Enzyme	164 *	136 *	2o3 *	121 **
Erwachsenen-tRNS + Neugeborenen-Enzyme	81	77	8o	95

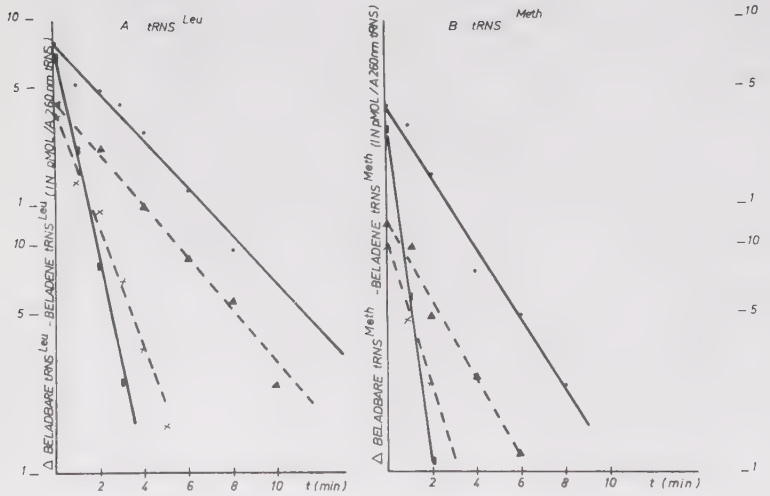
Mittelwerte aus je 4 verschiedenen Experimenten

* $P < o,ooi$, ** $P < o,oi$

Die Beladungsgrade der altershomologen Kontrollsysteme sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Um die biologischen Eigenschaften der Synthetasen-Fraktion aus Gehirn neugeborener und erwachsener Mäuse weiter zu charakterisieren, untersuchten wir anschließend die Kinetik der tRNS-Beladung. In Abbildung 14 ist die Abnahme unbeladener $tRNS^{Leu}$ und $tRNS^{Meth}$ in den zellfreien Beladungssystemen in Abhängigkeit von der Zeit semilogarithmisch wiedergegeben.

Abbildung 14:
Beladungskinetik der Hirn-tRNS neugeborener und erwachsener Mäuse.



Angegeben ist die Differenz zwischen beladbarer und beladener spezifischer $tRNS^{Leu}$ = A und $tRNS^{Meth}$ = B ; ■—■ = E.-N + tRNS-N ; ✚ - ✚ = E.-N + tRNS-E ; ▲ - ▲ = E.-E + tRNS-E; ●—●= E.-E + tRNS-N; E=Erwachsene, N=Neugeborene, E.=Enzym.

Berechnet man aus Abbildung 14 die Zeit,nach der jeweils die Hälfte der beladbaren spezifischen tRNS aminoacyliert ist, so ergeben sich für die Beladungsgeschwindigkeiten folgende Halbwertszeiten :

$tRNS^{Leu}$:

tRNS - N + Enzym - N = 0,69 min

tRNS - E + Enzym - E = 2,65 min

tRNS - N + Enzym - E = 2,84 min

tRNS - E + Enzym - N = 1,18 min

$tRNS^{Meth}$:

tRNS - N + Enzym - N = 0,43 min

tRNS - E + Enzym - E = 1,79 min

tRNS - N + Enzym - E = 1,80 min

tRNS - E + Enzym - N = 0,88 min .

Aus dem Vergleich der Halbwertszeiten ergibt sich, daß die Beladungsgeschwindigkeit der Neugeborenen-tRNS sowohl bei der $tRNS^{Leu}$ als auch bei der $tRNS^{Meth}$ etwa 4 mal so hoch ist wie die der Erwachsenen-tRNS. Die Geschwindigkeit der Beladung mit Synthetasen aus dem Gehirn erwachsener Mäuse ist dabei konstant, unabhängig davon , ob die tRNS neugeborener oder erwachsener Tiere aminoacyliert wird. Im Gegensatz dazu beladen die Leucin-spezifische und die Methionin -spezifische Synthethase aus Neugeborenen die gleichaltrigen tRNS doppelt so schnell wie die Hirn-tRNS erwachsener Mäuse.

Zusammenfassend ergeben die dargestellten Beladungsexperimente folgende Resultate:

1. Die tRNS aus Gehirn neugeborener Mäuse ist höher beladbar als die tRNS aus erwachsenen Tieren; auffallend ist da-

bei die besonders hohe Akzeptoraktivität der $tRNS^{Meth}$.

2. Die Endbeladung der Neugeborenen-tRNS ist bei Einsatz von Synthetasen aus Gehirn erwachsener Tiere höher als bei Verwendung der Neugeborenen-Enzyme.

3. Die Beladungsgeschwindigkeit der tRNS ist in den Neugeborenen-Systemen bei den geprüften $tRNS^{Leu}$ und $tRNS^{Meth}$ 4 mal so hoch wie in den Erwachsenen-Systemen.

4. Bei Verwendung der Hirn-Synthetasen aus erwachsenen Mäusen ist die Beladungsgeschwindigkeit konstant, unabhängig davon, ob Erwachsenen-tRNS oder Neugeborenen-tRNS beladen wird.

5. Die Hirn-Synthetasen neugeborener Tiere beladen die gleichaltrige tRNS doppelt so schnell wie die Hirn-tRNS aus erwachsenen Mäusen.

Die unterschiedliche Beladbarkeit der Hirn-tRNS neugeborener und erwachsener Mäuse wirft die Frage auf, ob der limitierende Faktor der Proteinsynthese im Gehirn erwachsener Tiere allein die tRNS ist, oder ob darüber hinaus auch andere Faktoren in der Fraktion der Enzyme oder Ribonukleoproteid-Partikel für die erhöhte Inkorporation von Aminosäuren in den zellfreien Systemen mit Polysomen und Mitochondrien aus neugeborenen Tieren verantwortlich zu machen sind. Wir untersuchten deshalb im Kreuzexperiment die biologische Aktivität der einzelnen Komponenten des Protein synthetisierenden Apparates aus Gehirn neugeborener und erwachsener Mäuse in zellfreien tRNS-abhängigen polysomalen Systemen. Das Ergebnis ist in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tabelle 16 : Einbauaktivität zellfreier Systeme aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn mit tRNS , Polysomen oder Enzymen aus altersunterschiedlichem Gewebe

Austausch von :	Einbaurate in % der Kontrollen mit Bestandteilen gleichen Alters	
	Neugeborenen - Systeme	Erwachsenen - Systeme
tRNS	6o (5)	172 (5)
Enzymen	155 (3)	61 (3)
Polysomen	61 (5)	134 (5)

* $P < o,ooi$ für alle Werte ; ( ) Anzahl der Experimente

Die biologischen Aktivitäten der altershomologen Kontrollsysteme sind Tabelle 13 zu entnehmen.

In Tabelle 16 ist zunächst erkennbar, daß die Hirn-tRNS neugeborener Mäuse nicht nur höher und schneller beladen wird, sondern auch für eine Stimulierung der Protein synthetisierenden Aktivität des polysomalen Gesamt-Systems verantwortlich ist: Zusatz der Neugeborenen-tRNS zum Erwachsenen -System führt zu einer Aktivitätssteigerung auf 172 Prozent, während umgekehrt der Einsatz der Erwachsenen-tRNS in das Neugeborenen-System eine Verringerung des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein um 4o Prozent gegenüber der Kontrolle zur Folge hat. Unabhängig von der tRNS zeigt sich, daß auch die Polysomen aus dem Gehirn neugeborener Tiere eine höhere biologische Aktivität als die aus erwachsenen Mäusen aufweisen: durch Zugabe der Neugeborenen -Polysomen zum Erwachsenen-System wird eine Aktivitätssteigerung um 34 Prozent erzielt, während die Einbaurate des Neugeborenen-Systems durch die Erwachsenen-Polysomen um 39 Prozent erniedrigt wird. Im Gegensatz zu der Aktivität der tRNS und der Polysomen findet sich dagegen wie bei dem Beladungssystemen eine deutlich geringere Aktivität der Enzymfraktion aus Gehirn neugeborener Tiere gegenüber den Erwachsenen: das Neugeborenen-System wird durch Zusatz der Erwachsenen-Enzyme um 55 Prozent stimuliert, während die Einbaurate des Erwachsenen-Systems durch Einsatz des Neugeborenen-Enzyms auf 61 Prozent des Kontroll-Systems abfällt.

Die in vitro gefundene schnellere und höhere Beladung der geprüften spezifischen tRNS-Spezies weist auf eine erhöhte Akzeptorfunktion der Neugeborenen-tRNS hin. Die gesteigerte Einbauaktivität der polysomalen Systeme aus Gehirn erwachsener Tiere nach Zugabe der Neugeborenen-tRNS zu den in vitro - Systemen kann unabhängig von der Akzeptorfunktion aber auch eine Änderung der Bindung dieser aminoacylierten tRNS an das Ribosom andeuten. Wir untersuchten deshalb im Kreuzexperiment diese Transferfunktion der tRNS aus neugeborenen und erwachsenen Mäusen in tRNS abhängigen polysomalen Hirnsystemen, nachdem die tRNS vorher präparativ beladen worden war. Das Ergebnis zeigt Tabelle 17.

Nach Tabelle 17 führt die Zugabe präparativ beladener Neugeborenen-tRNS zu einer Steigerung des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den Systemen mit Polysomen und Enzymen aus Gehirn der erwachsenen Tiere auf 134 Prozent der Kontrollsysteme mit Erwachsenen-tRNS. Umgekehrt sinkt die Einbaurate im Neugeborenen-System durch Zugabe der beladenen Erwachsenen-tRNS um 3o Prozent. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß nicht nur die Akzeptorfunktion, sondern auch die Transferfunktion der Hirn-tRNS neugeborener Mäuse gegenüber der tRNS aus erwachsenen Tieren gesteigert ist.

Tabelle 17 : Einbau markierter Aminosäuren durch zellfreie Systeme mit Polysomen aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn nach Sättigung mit vorbeladener tRNS aus altersunterschiedlichem Gewebe

Vorbeladene tRNS aus :	Einbaurate in % der altersgleichen Kontrollen	
	Neugeborenen-System	Erwachsenen-System
Neugeborenen - Hirn	1oo (2)	132 (2)
Erwachsenen - Hirn	7o (2)	1oo (2)

( ) Anzahl der Experimente ; vorbeladene tRNS aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn wurden isoliert durch kalte Phenolextraktion nach Inkubation der tRNS mit (^{14}C)-Aminosäuren ; 3 A_{26o}-Einheiten Erwachsenen-tRNS (4723 dpm/A_{26o}) oder 3 A_{26o}-Einheiten Neugeborenen-tRNS (5216 dpm/A_{26o}) wurden dann zu den polysomalen Systemen gegeben .

Bei der Untersuchung der Eigenschaften des Protein synthetisierenden Apparates im Gehirn neugeborener Mäuse beschäftigten wir uns schließlich mit der Frage, ob die gefundenen Unterschiede in der Konzentration extrahierbarer tRNS und in der Verteilung der Ribonukleoproteid-Partikel auch auf DNS -Basis eine altersabhängige Abnahme des tRNS-Gehaltes und der Polysomen repräsentieren. Dazu wurde der DNS-Gehalt in den Hirnen mit der Diphenylamin-Methode bestimmt (69). Im Neugeborenen - Hirn finden sich 3mg DNS/ g Organgewicht, im Gehirn erwachsener Tiere liegt die DNS-Konzentration bei 1,4 mg/ g Organgewicht. Danach entsprechen 8,1 A_{260nm} tRNS im Neugeborenen -Hirn pro Gramm Organgewicht ebenso 2,7 A_{260nm} tRNS / mg DNS wie 3,8 A_{260nm} tRNS pro Gramm Gehirn erwachsener Mäuse. Der Polysomen-Gehalt im Gehirn der neugeborenen Mäuse ist dagegen auch auf DNS-Basis mit 8,5 A_{260nm} / mg DNS gegenüber 6,4 A_{260nm}/mg DNS im Erwachsenen-Hirn erhöht.

6. Einfluß psychotroper Substanzen auf die zellfreien Systeme.

Die Entdeckung der materiellen Basis der genetischen Information in Gestalt der DNS und des Mechanismus der Genexpression führten zu der Annahme , daß auch Leistungen des Gehirns in ähnlicher Weise molekular verankert sein könnten. Diese Vorstellung bezog sich in erster Linie auf die Gedächtnisfunktion, zumal sich ebenfalls Hinweise für eine Fixierung des immunologischen Gedächtnisses in der Sequenz der Basen der DNS immunkompetenter Zellen fanden (7o). Erste Mitteilungen über eine Änderung des Stoffwechsels der Nukleinsäuren und Proteine im Gehirn während eines Lernvorgangs stammen von Hydén (71-73) , eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei Glassman (74).

Der experimentell hinreichend gesicherte Zusammenhang einzelner Hirnleistungen mit dem Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel dieses Organs führte uns zu der Frage, ob Substanzen, deren pharmakologische Wirkungen auf psychische Funktionen bekannt sind, auf molekularer Ebene auch den Proteinstoffwechsel des Gehirns beeinflußen. So fanden wir am biochemischen Modell des Rattenhirns eine konzentrationsabhängige Hemmung des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein durch Zugabe des Neuroleptikums CHLORPROMAZIN zu zellfreien Systemen der Proteinsynthese (75). Grundlage dieses Hemmeffekts war die Blockierung der Aminoacylierung der Hirn-tRNS, Wirkort der Substanz der Komplex Aminoacyl-Synthetase - tRNS. Das Ergebnis dieser experimentellen Untersuchungen ließ die Annahme eines gegensätzlichen Wirkungsmechanismus auf den Proteinstoffwechsel bei Substanzen mit pharmakologisch ebenfalls gegensinnigen Eigenschaften

gerechtfertigt erscheinen. Wir prüften deshalb den Einfluß von LSD-Tartrat auf die zellfreien Systeme aus Gehirn erwachsener Mäuse (Tabelle 18) .

Tabelle 18 : Einfluß von LSD-Tartrat auf die Aktivität zellfreier Systeme aus Mäusehirn

System	Einbau markierter Aminosäuren *	
	Kontrollen (dpm/mg Protein)	+ 1 µM LSD (% der Kontrollen)
freie Polys.	53796 ± 7876	129 ± 3
membrangeb. Polys.	47988 ± 6125	124 ± 2
freie Ribos.	86124 ± 7145	125 ± 6
Mitochondrien	2644 ± 322	122 ± 4
Synaptosomen	2516 ± 439	125 ± 3
Mikrosomen	36914 ± 4910	155 ± 8
S 12000 x g	6790 ± 590	164 ± 7

* Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelexperimenten ± Standardabweichungen ; angegeben die maximalen Einbauraten nach 60 min. Inkubation .

Nach Tabelle 18 führt die Zugabe von LSD in allen Systemen zu einer Steigerung des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein. Dabei ist die Aktivitätssteigerung der am wenigsten gereinigten Systeme mit Mikrosomen und dem postmitochondrialen Überstand (S 12000 x g) am höchsten .

In einer weiteren Versuchsreihe ermittelten wir die Konzentrationsabhängigkeit der gefundenen LSD-Wirkung auf die Einbauaktivität der zellfreien Systeme mit freien Polysomen und postmitochondrialem Überstand (Tabelle 19) .

Tabelle 19 : Konzentrationsabhängigkeit der LSD-Wirkung auf die zellfreien Systeme

LSD-Konzentration (µM)	Einbauaktivität (% der LSD-freien Kontrollen) *	
	Polysomen	S 12000 x g
0,001	99	106
0,01	108	115
0,1	121	136
1	131	165
10	92	131
100	97	116

* Mittelwerte aus je 2 Konzentrationsreihen

Nach Tabelle 19 werden die Einbauaktivitäten beider Systeme bereits bei einer molaren LSD-Konzentration von 1×10^{-8} in den Ansätzen erhöht, während die höchste Stimulation in einem molaren Konzentrationsbereich von 1×10^{-7} bis 1×10^{-6} beobachtet wird. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt

dagegen in beiden Systemen zu einer Abnahme der stimulierenden Wirkung der Substanz .

Zur Bestimmung des Wirkorts des LSD untersuchten wir zunächst den Einfluß dieser Substanz auf die Beladung der Hirn - tRNS (Tabelle 2o) .

Tabelle 2o : Einfluß von LSD-Tartrat auf die Beladung der tRNS aus Mäusehirn

tRNS	Aminoacylierung *	
	Kontrollen (pMol AS/ A_{260} tRNS)	+ 1 µM LSD (% der Kontrollen)
Phe	31,4 ± o,9	12o ± 3
Lys	27,o ± 1,o	137 ±14
Leu	47,8 ± 3,5	87 ± 7
Met	24,4 ± 2,1	137 ± 5

* Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten ± Standardabweichungen; Endbeladung nach 15 min Inkubation .

Nach Tabelle 2o ist die Akzeptorfunktion der geprüften $tRNS^{Phe}$, $tRNS^{Lys}$ und $tRNS^{Met}$ nach Zugabe der Substanz zu den Beladungssystemen gesteigert. Die Aminoacylierung der $tRNS^{Leu}$ wird dagegen durch Zugabe des LSD eher gehemmt.
Durch Einsatz präparativ vorbeladener (^{14}C)Phe-tRNS in ein Poly U abhängiges Polyphenylalanin synthetisierendes System mit Hirn-Ribosomen wurde anschließend geprüft, ob die Aminoacylierung der tRNS der einzige durch das LSD beeinflußte Schritt während der Proteinsynthese ist. Dabei fand sich eine

Stimulierung der Einbauaktivität des zellfreien Systems auf 141 $\pm$ 6 Prozent durch Zugabe der Substanz zu den Testansätzen (Konzentration: 1 x $1o^{-6}$ M).

Zur Klärung der Frage , ob es sich bei der stimulierenden Wirkung des LSD um einen organspezifischen Effekt handelt, untersuchten wir schließlich den Einfluß dieser Substanz auf ein zellfreies System mit Polysomen aus Mäuseleber. Bei einer molaren Konzentration des LSD von 1 x $1o^{-6}$ in den Ansätzen ist der Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in diesem System auf 132 $\pm$ 9 Prozent der Kontrollen ohne die Substanz erhöht.

7. Einfluß von Neurotransmittern auf die Proteinsynthese.

a. GABA .

Die experimentellen Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Lernvorgängen und Gedächtnisformation einerseits und dem Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine anderseits führten uns zu der Überlegung, ob die Neurotransmitter, deren Rolle als humorale Überträger der Nervenerregung an den Synapsen bekannt ist, nicht auch auf molekularer Basis eine regulatorische Funktion bei der Proteinsynthese im Gehirn haben. Von dieser Frage ausgehend beschäftigten wir uns zunächst mit dem Einfluß der γ- Aminobuttersäure (GABA) auf die zellfreien Systeme aus Gehirn erwachsener Mäuse. Diese Substanz wurde deshalb zuerst geprüft, weil GABA einerseits Eigenschaften aufweist, die es erlauben, ihr die Funktion eines inhibitorischen Neurotransmitters zuzuordnen (76 - 78). Zum anderen gibt es Hinweise darauf, daß GABA eine allgemeine Bedeutung im Zellstoffwechsel zukommt. GABA ist nicht nur im Nervensystem und anderen Organen enthalten, sondern wird zum Beispiel auch in Bakterien synthetisiert (79). Ein Zusammenhang scheint zu bestehen zwischen dieser Substanz und den Polyaminen. Denn unabhängig von dem Syntheseweg über die Glutaminsäure soll GABA in Vertebraten aus Putrescin , in Fischen und Säugern aus Spermin und Spermidin gebildet werden (8o - 81). Diese Substanzen kommen aber in nahezu allen Zellen vor und spielen bei der Regulation zahlreicher Stoffwechselprozesse eine wesentliche Rolle (82 - 83).
Im Gesamthirn liegt die GABA-Konzentration bei 1 bis 8 µg / g Feuchtgewicht (84) . Die regionale Verteilung scheint jedoch sehr unterschiedlich zu sein. Im Rattenhirn weisen Cerebellum und Rückenmark den höchsten GABA-Gehalt auf (85).

Die zelluläre Verteilung der Substanz zwischen Glia und Nervenzellen scheint in den einzelnen Hirnregionen gleich zu sein (86). Die Blut-Hirnschranke passiert GABA unter physiologischen Bedingungen nicht (87). Deshalb ist ein Einfluß dieser Substanz auf die Proteinbiosynthese im Gehirn nach Applikation in vivo nicht zu erwarten. Deshalb untersuchten wir die Wirkung der GABA auf die zellfreien Protein synthetisierenden Systeme aus Mäusehirn (Tabelle 21).

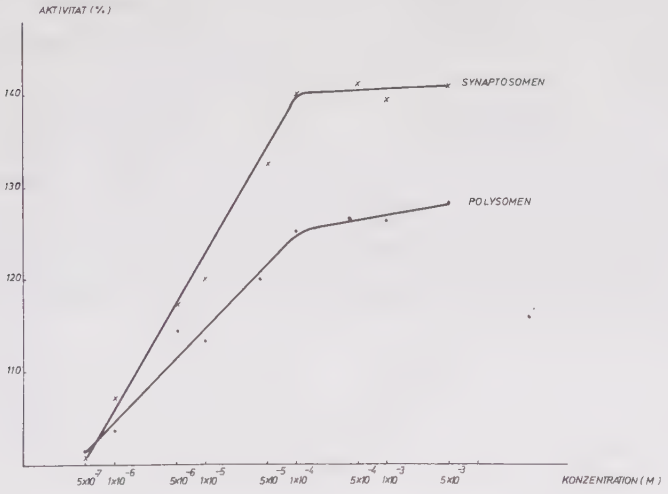
Tabelle 21 : Einfluß der GABA auf die zellfreien Systeme aus Mäusehirn und Mäuseleber

Gewebe	System	Einbau markierter Aminosäuren * Kontrollen (dpm/mg Protein)	+ 1oo µM GABA (% der Kontrollen)
Gehirn	freie Polys.	6o4oo ± 1o1oo	126 ± 2 + (6)
	membrangeb. P.	596oo ± 119oo	126 ± 3 + (5)
	Mitochondrien	24oo ± 49o	137 ± 4 + (5)
	Synaptosomen	28oo ± 6oo	14o ± 4 + (5)
Leber	Polys.	293oo ± 53oo	1o3 ± 4 (3)
	Mitochondrien	17oo ± 3oo	96 ± 5 (3)

* Mittelwerte ± Standardabweichungen ; + $P < o,oo1$;
( ) Anzahl der Versuche ; angegeben die maximalen Einbauraten nach 6o min Inkubation = polysomale Systeme oder 8o min Inkubation = mitochondriale und synaptosomale Systeme.

Nach Tabelle 21 wird durch Zugabe der GABA zu den zellfreien Hirnsystemen die Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein deutlich erhöht. Die größte Steigerung der Einbauaktivität findet sich dabei in den Systemen mit Mitochondrien und Synaptosomen. Dieser GABA-Effekt scheint organspezifisch zu sein, da die zum Vergleich geprüften zellfreien Systeme mit Polysomen und Mitochondrien aus Mäuseleber nicht beeinflußt werden. Die Abhängigkeit dieser stimulierenden Wirkung von der GABA-Konzentration in den Systemen mit freien Hirn-Polysomen und Synaptosomen zeigt Abbildung 15.

Abbildung 15 :
Konzentrations-Abhängigkeit der GABA-Wirkung in den Hirnsystemen mit freien Polysomen und Synaptosomen.



Aktivität der Kontrollsysteme ohne GABA = 1oo % ; 1 A_{260nm} Polysomen + 16o µg pH 5- Protein oder 37o µg synaptosomales Protein/125 µl Ansatz ; Inkubation 6o min. 37 ^{o} C ; Aktivitäten = Mittelwerte aus je 3 Konzentrationsreihen; Auftragung semilogarithmisch

Aus Abbildung 15 ist zu ersehen, daß die stimulierende Wirkung der GABA auf die zellfreien Systeme mit Synaptosomen und freien Polysomen in dem molaren Bereich zwischen 10^{-4} und 10^{-6} offenbar konzentrationsabhängig ist.

Zur Bestimmung des Wirkortes der Substanz untersuchten wir zunächst den Einfluß auf die Aminoacylierung der Hirn - tRNS (Tabelle 22).

Tabelle 22 : Einfluß der GABA auf die Beladung der Hirn-tRNS

tRNS	Beladung *	
	Kontrollen (pMol AS/A_{260} tRNS)	+ 100 µM GABA (% der Kontrollen)
Phe	33,6 ± 1,2	134 ± 4 + (5)
Lys	28,9 ± 0,8	159 ± 7 + (7)
Leu	46,9 ± 5,9	160 ± 9 + (7)
Met	22,9 ± 2,2	158 ±11 + (4)

* Mittelwerte ± Standardabweichungen ; + $P < 0{,}001$; ( ) Anzahl der Versuche ; angegeben die Endbeladung nach 15 min Inkubation .

Nach Tabelle 22 ist die Beladung der geprüften tRNS durch Zugabe der GABA zu den Beladungssystemen deutlich stimulierbar.

Der Einfluß der Substanz auf die Transferfunktion der tRNS wurde geprüft in einem polysomalen System, daß vorher mit präparativ beladener tRNS gesättigt wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 23 wiedergegeben.

Tabelle 23 : Einfluß der GABA auf die Aktivität zellfreier Systeme mit Polysomen nach Sättigung mit beladener tRNS

Experiment Nr.	Einbaurate markierter Aminosäuren		
	Kontrolle (dpm/mg Polys.)	+ 1oo µM GABA (dpm/mg Polys.)	%
I	875o	868o	99
II	1132o	113oo	1oo

(^{14}C)Phe-tRNS wurde nach Inkubation der Hirn-tRNS mit (^{14}C)Phenylalanin (468mCi/mMol) in einem Standardsystem der Aminoacylierung durch kalte Phenolextraktion isoliert ;eingesetzt in die polysomalen Systeme wurden dann 4 A_{26o}-Einheiten (2256 dpm/A_{26o}) ; maximale Einbaurate nach 6o min. Inkubation.

Nach Tabelle 23 wird das mit beladener $tRNS^{Phe}$ gesättigte polysomale System durch GABA in der angegebenen Konzentration nicht mehr stimuliert. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß weder die Transferfunktion der Hirn-tRNS noch ein anderer Schritt während der Peptidkettenverlängerung durch diese Substanz beeinflußt werden. Die stimulierende Wirkung auf den Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den zellfreien Systemen scheint somit auf einer Wechselwirkung zwischen GABA und der Aminoacylierung der Hirn-tRNS zu beruhen.

Zu klären blieb die Frage, ob der Wirkort der GABA die tRNS selbst ist, oder ob diese Substanz die Aktivität der Synthe-

tasen beeinflußt . Wir prüften deshalb im Kreuzexperiment mit $tRNS^{Phe}$ den Einfluß von GABA auf die zellfreien Beladungssysteme mit tRNS uns Synthetasen aus Mäusehirn und Mäuseleber (Tabelle 24) .

Tabelle 24 : Einfluß der GABA auf die Aminoacylierung der $tRNS^{Phe}$ in heterologen Beladungssystemen aus Mäusehirn und Mäuseleber

	Aminoacylierung der tRNS	
	Hirn-Synthetasen	Leber-Synthetasen
	(% der GABA - freien Kontrollen) *	
Hirn-$tRNS^{Phe}$	134 ± 4 (5)	137 ± 6 (3)
Leber-$tRNS^{Phe}$	79 ± 8 (3)	92 ± 5 (3)

*Mittelwerte ± Standardabweichungen ; ( ) Anzahl der Versuche ; GABA-Konzentration in den Ansätzen 1oo µM

Nach Tabelle 24 stimuliert GABA in der angegebenen Konzentration nicht nur die Aminoacylierung der $tRNS^{Phe}$ in den Beladungssystemen mit Hirn-Synthetasen und Hirn-tRNS, sondern auch in den Systemen mit der heterologen Enzymfraktion aus Mäuseleber. Die Beladung der $tRNS^{Phe}$ aus Mäuseleber wird dagegen durch GABA sowohl im homologen System als auch in den Ansätzen mit Hirn-Enzymen eher gehemmt. Danach scheint die tRNS selbst Wirkort des beobachteten GABA-Effekts zu sein .

b. Andere Neurotransmitter

Die in den zellfreien Systemen aus Mäusehirn gefundene Wirkung der GABA auf den Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein führte zu der Frage, ob auch andere Substanzen, denen eine Rolle als chemische Überträger der Nervenerregbarkeit an den Synapsen zugeordnet wird, die in vitro-Synthese der Hirnproteine beeinflußen. Wir begannen deshalb die orientierende Untersuchung der Catecholamine Dopamin und Noradrenalin, des Monoamins Serotonin , des Azetylcholins sowie der Aminosäuren Glycin, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Geprüft wurde der Einfluß dieser Substanzen auf die Systeme mit freien Polysomen und Synaptosomen. Die Ergebnisse sind zusammengefaßt in Tabelle 25.

Tabelle 25 : Einfluß von Neurotransmittern auf die Aktivität zellfreier Systeme aus Mäusehirn

Substanz	Einbau markierter Aminosäuren *	
	Polysomen	Synaptosomen
	(% der Transmitter-freien Kontrollen)	
Dopamin	66	133
Noradrenalin	76	1o2
Serotonin	64	123
Azetylcholin	1o1	121
Glycin	126	12o
Alanin	1o1	128
Asparaginsäure	64	73
Glutaminsäure	67	69

*Mittelwerte von je 2 Experimenten ; Konzentration der Substanzen in den Ansätzen 1oo µM .

Tabelle 25 ist zu entnehmen, daß der Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den geprüften zellfreien Systemen mit freien Polysomen und Synaptosomen aus Mäusehirn durch Zugabe der Neurotransmitter verändert wird. Überraschend ergibt sich dabei, daß nicht nur die verschiedenen Substanzen eine unterschiedliche Wirkung auf die Einbauaktivität der Systeme ausüben, sondern daß zum Teil auch die einzelnen Transmitter die polysomalen Systeme in anderer Weise als die Systeme mit Synaptosomen beeinflußen.

Glutaminsäure und Asparaginsäure hemmen sowohl die Einbauaktivität der polysomalen als auch die der synaptosomalen Systeme deutlich. Umgekehrt werden beide Systeme durch Glycin stimuliert. Azetylcholin und Alanin beeinflußen in der angegebenen Konzentration die polysomalen Systeme nicht, erhöhen aber den Einbau markierter Aminosäuren in den Ansätzen mit Synaptosomen. Noradrenalin hemmt die polysomalen Systeme, zeigt dagegen keine Wirkung auf die synaptosomale in vitro - Synthese der Hirnproteine. Dopamin und Serotonin hemmen die polysomalen Systeme deutlich, die Aktivität der Testsysteme mit Synaptosomen wird dagegen durch Zugabe dieser Substanzen stimuliert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß dieser Neurotransmitter auf zellfreie Systeme mit Hirn-Mitochondrien untersucht. Wesentliche Unterschiede gegenüber dem synaptosomalen System fanden sich dabei nicht. Zur näheren Charakterisierung des Wirkortes dieser Substanzen untersuchten wir dann die Wirkung der Transmitter auf die Aminoacylierung der Hirn - $tRNS^{Leu}$. Eine signifikante Änderung des Beladungsgrades konnten wir aber in keinem Falle nachweisen. Im Vergleich zur GABA muß deshalb der mögliche Wirkort die-

ser Substanzen in einer späteren Phase der Proteinsynthese zu suchen sein.

Um einen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht auszuschliessenden regulatorischen Einfluß der geprüften Neurotransmitter auf die Proteinsynthese im Gehirn gezielter untersuchen zu können, haben wir an dieser Stelle die Messung der in vitro-Synthese der Proteine im Gesamthirn der Maus beendet und mit der Isolierung und Optimierung zellfreier Systeme aus Großhirnrinde , Hirnstamm und Cerebellum der Ratte begonnen. Anschließend ist die weitere Untersuchung des Einflusses dieser Substanzen auf die Proteinsynthese in den einzelnen Hirnregionen vorgesehen.

DISKUSSION .

Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag zu den Bemühungen sein, einen Einblick in die Synthese der Hirnproteine zu gewinnen und regulatorische Vorgänge um diesen Stoffwechselprozess im Zentralnervensystem deutlich zu machen. Methodisch wurde die Technik der zellfreien Proteinsynthese verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Isolierung der einzelnen Komponenten des Protein synthetisierenden Apparates der Zelle in möglichst reiner Form. Diese werden dann unter bestimmten experimentellen Bedingungen im Reagenzglas mit radioaktiv markierten Aminosäuren als Vorstufen der zu synthetisierenden Proteine zusammengebracht und bei einer Temperatur von 32 bis 37° Celsius inkubiert. Als Maß der biologischen Aktivität solcher zellfreien Systeme dient die Einbaurate der markierten Aminosäuren in säurefällbares Protein. Eine Vielzahl grundlegender Experimente, die zur Isolierung solcher Systeme der " in vitro - Proteinsynthese " erforderlich sind, führten wir an dem Keim E. coli MRE 600 durch. Dieser Weg wurde bewußt eingeschlagen, weil einerseits der Mechanismus der Proteinsynthese in Mikroorganismen einfacher und damit eingehender erforscht ist. Anderseits diente das optimierte bakterielle System neben einem zellfreien System aus Leber bei verschiedenen Untersuchungen zur Proteinsynthese im Gehirn der Erfassung spezies- oder organspezifischer Besonderheiten.

Die Isolierung zellfreier Protein synthetisierender Systeme aus Gehirn begannen wir dann mit der Präparation cytoplasmatischer Ribosomen und Polysomen, an denen sicher auch im Nervensystem die Mehrzahl der Proteine synthetisiert wird. Erste Mitteilungen einer erfolgreichen Isolierung dieser Ribonukleoproteid-Partikel stammen von HANZON und TOSCHI (88),

RENDI und HULTIN (89), sowie von SATAKE und Mitarbeitern (90) ; bei diesen Partikeln handelte es sich vorwiegend um monomere Ribosomen, deren Protein synthetisierende Aktivität in den zellfreien Systemen erst nach Zugabe künstlicher mRNS (Poly U, Poly A) bestimmt werden konnte. Hirneigene mRNS-Ribosomen-Komplexe in Gestalt der Polysomen wurden zuerst von TAKAHASHI und Mitarbeitern (91), CAMPAGNONI und MAHLER (92), sowie von ZOMZELY und Mitarbeitern (30) durch Verwendung diskontinuierlicher Zucker-Gradienten isoliert und charakterisiert. Diese Präparationstechnik wurde in der Folge vielfach modifiziert und zum Teil verbessert. Im Rahmen unserer Untersuchungen ergab das von LERNER angegebene Isolierungs-Schema die günstigsten Resultate hinsichtlich Ausbeute und biologischer Aktivität der Ribonukleoproteid-Partikel.(29).

Bei der Charakterisierung der Polysomen und Ribosomen gelingt die Differenzierung zwischen freien und an die endoplasmatischen Membranen gebundenen Partikeln bereits elektronenmikroskopisch (93-94). Dabei findet sich in den Zellen der einzelnen Organe ein zum Teil sehr unterschiedliches Verhältnis zwischen freien und membrangebundenen Partikeln. So kommen in den Retikulozyten Polysomen und Ribosomen nur in freier Form vor, während sie in den ß-Zellen des Pankreas ausschließlich membrangebunden vorliegen. Auch die Leber weist einen erheblich höheren Gehalt an membrangebundenen Partikeln auf. Morphologische und biochemische Untersuchungen weisen daraufhin, daß im Gehirn die Nervenzellen einen sehr hohen Gehalt an freien Polysomen und Ribosomen besitzen, während diese Partikel in der Glia vorwiegend in membrangebundener Form vorliegen (30, 95 - 96). Danach müssen Polysomen und Ribosomen, die bei der fraktionierten Zentrifugation der Hirnhomogenate in

freier Form, also nicht an die endoplasmatischen Membranen gebunden sedimentieren, vornehmlich neuronalen Ursprungs sein, während die membrangebundenen Partikel weitgehend der Glia entstammen. Eine getrennte Isolierung der freien und gebundenen Partikel ist möglich, da die gebundenen Polysomen und Ribosomen erst durch Behandlung mit Detergentien von den endoplasmatischen Membranen abgelöst werden können.

Bei Isolierung der Ribonukleoproteid-Partikel aus dem Gehirn erwachsener Mäuse nach dem von uns standardisierten Verfahren liegt die Gesamt-Ausbeute bei 28,2 A_{260nm} pro Gramm Organgewicht. Dieses stimmt gut überein mit den von LERNER mitgeteilten Ergebnissen, der eine Ausbeute von 23 A_{254nm} Gesamt-Polysomen pro Gramm Erwachsenen- Hirn erhält (Absorptionsmaximum der UV-Spektren bei 258nm). In dem von LERNER angegebenen Wert sind die monomeren Ribosomen ebenfalls enthalten, da er offensichtlich durch qualitative Analyse der Ribonukleoproteid-Verteilung nach Zentrifugation in linearen Saccharose-Gradienten ermittelt wurde. Auch beim Vergleich des Gehaltes freier und membrangebundener Polysomen und Ribosomen im Gehirn erwachsener Tiere ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede. Das von LERNER angegebene Verhältnis freier zu membrangebundener Partikel beträgt 4o zu 6o , wir selbst ermittelten ein Verhältnis von 37 zu 63 . Bei Isolierung aus der Hirnrinde erwachsener Ratten finden ZOMZELY und Mitarbeiter ein ähnliches Verhältnis freier zu membrangebundener Ribonukleoproteid-Partikel von 42 zu 58 (97) .

Von den im Rahmen unserer Untersuchungen pro Gramm Gehirn erhaltenen freien Ribonukleoproteid-Partikeln liegen 36 Prozent, von den membrangebundenen Partikeln 4o Prozent als Polysomen vor. Im Gegensatz dazu gibt LERNER bei den freien

Partikeln den Anteil an Polysomen mit 8o Prozent, bei den membrangebundenen Partikeln mit 65 Prozent an. Ein Vergleich dieser Ergebnisse ist deshalb kaum möglich, weil das Verhältnis der monomeren Ribosomen zu den Ribosom-mRNS-Komplexen nicht nur von den experimentellen Bedingungen bei der Zellfraktionierung (Magnesium - Konzentration) abhängt, sondern auch von anderen Faktoren beeinflußt wird wie der Protein synthetisierenden Aktivität im Gehirn der Tiere vor der Tötung, der Zeitspanne zwischen Dekapitation und Einfrieren des Gewebes, oder der Dauer der Aufbewahrung der Gehirne bis zur fraktionierten Zentrifugation.

Während die biologischen Aktivitäten verschiedener Chargen einer einzelnen Polysomen-Präparation eine Schwankungsbreite von ± 12 Prozent aufwiesen, waren die Einbauraten markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den zellfreien Systemen mit Polysomen aus verschiedenen Präparationen erwartungsgemäß unterschiedlich. Als Maßzahl für die Aktivität der optimierten Systeme mit freien und membrangebundenen Polysomen sind deshalb in Tabelle 5 die zentralen Werte nach Ordnung der ermittelten Einbauraten der Höhe nach angegeben. Dieser Medianwert liegt in den Systemen mit freien Polysomen bei 30743 dpm/mg Polysomen, in den Systemen mit membrangebundenen Partikeln bei 27423 dpm/mg Polysomen. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren recht gut überein (21 , 97) und entsprechen in der Höhe auch der Einbauaktivität des von uns zum Vergleich isolierten zellfreien Systems mit Polysomen aus Mäuseleber.

Da die Einbaurate in den Systemen mit freien Polysomen Rückschlüsse auf die Proteinbiosynthese in den Nervenzellen, in den Ansätzen mit membrangebundenen Polysomen dagegen eher

Aussagen über die Protein synthetisierende Aktivität in der Glia erlaubt, ist eine getrennte Bestimmung der Aktivitäten dieser Systeme sinnvoll. Die von uns isolierten Systeme weisen jedoch weder hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der Zugabe exogener tRNS und energiereicher Phosphate, noch in ihrer Aminosäuren inkorporierenden Aktivität wesentliche Unterschiede auf. Nach Isolierung von Polysomen aus Rattenhirnrinde kommt ROBERTS zu ähnlichen Ergebnissen (98), während ANDREWS und TATA ebenso wie MURTHY eine höhere Einbauaktivität der membrangebundenen Ribonukleoproteid-Partikel beschreiben (99 - 1oo).

Die Untersuchung der biologischen Aktivität der Hirn - Ribosomen erfordert die Zugabe synthetischer homopolymerer Nu - kleotide mit messenger-Funktion zu den zellfreien Ansätzen . Der von diesen künstlichen Matrizen gesteuerte Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Material ist in prokaryotischen Systemen der zellfreien Proteinsynthese der wesentlichste experimentelle Zugang zur Untersuchung des Protein synthetisierenden Apparats, da im Gegensatz zu den Eukaryonten die Halbwertszeit bakterieller mRNS kaum 2o Minuten übersteigt (1o1 - 1o2). Wegen fehlender Initiations-Codons kann in diesen in vitro-Ansätzen der Start der Proteinsynthese nur durch drastische Erhöhung der Magnesium-Konzentration auf ein mehrfaches des Optimums für die zelleigenen mRNS-Ribosomen-Komplexe erzwungen werden (1o3). Da die synthetischen messenger auch keine Terminationssignale besitzen, wird in den ribosomalen Systemen ausschließlich die Verlängerung der wachsenden Peptidkette am Ribosom (Elongation) gemessen.
Die Poly U abhängige Synthese von Poly-Phenylalanin liegt in den optimierten Hirnsystemen mit freien Ribosomen bei einem

Medianwert von 3,7 nMol Phenylalanin/nMol Ribosomen und damit deutlich höher als die Einbaurate von 2,o3 nMol Phenylalanin /nMol membrangebundener Partikel. Beide Systeme sind erwartungsgemäß abhängig von der Zugabe " exogener " tRNS, da die " endogene " tRNS bei der Zentrifugation durch diskontinuierliche Saccharose-Gradienten gebunden an die Polysomen-Fraktion sedimentiert. Die geringere tRNS-Abhängigkeit des zellfreien Systems mit membrangebundenen Ribosomen führen wir dabei ebenso wie die schwächere Einbauaktivität auf einen niedrigeren Reinheitsgrad dieser Partikel oder auf eine Aktivitätseinbuße durch die notwendige Behandlung mit Detergentien zurück. Ein Poly-Phenylalanin synthetisierendes System mit Ribosomen aus Mäuseleber zeigt den Ansätzen mit freien Hirn -Ribosomen entsprechende Einbauraten. Die Aktivität eines ribosomalen Gesamtsystems aus Rattenhirn liegt dagegen bei 14o Prozent der Einbaurate des gleichen Systems aus Rattenleber. Die Syntheserate markierten Poly-Phenylalanins in diesem System entspricht dabei 4 Prozent der Einbauaktivität eines zum Vergleich isolierten zellfreien Systems aus E. coli MRE 6oo (75) .

Während Mc LEAN und Mitarbeiter bereits 1958 berichteten, daß Mitochondrien aus Leber und Muskelgewebe in vivo und in vitro radioaktiv markierte Aminosäuren inkorporieren (1o4), stammen erste Hinweise auf die Existenz eines autonomen Protein synthetisierenden Apparates in den Hirn-Mitochondrien von KLEE und SOKOLOFF (1o5). Da die DNS in diesen Organellen aufgrund ihrer geringen Größe nicht genügend Informationen zur Codierung aller Struktur- und Enzymproteine besitzen kann, ist jedoch auch die Synthese der Eiweißkörper in den

Mitochondrien mit der Funktion des Zellkerns verknüpft (1o6 - 1o7). Die mitochondriale DNS besitzt dabei offenbar vorwiegend codogene Abschnitte für einen Teil der die innere Membran bildenden Strukturproteine (1o8 - 1o9), während die mitochondrialen Enzyme ebenso wie die Proteine der Ribosomen und die Faktoren der Proteinsynthese von der Kern-DNS codiert werden (11o) .

Der Medianwert der Einbauraten markierter Aminosäuren in unseren optimierten zellfreien Systemen mit Hirn-Mitochondrien liegt bei 278o dpm/mg mitochondriales Protein. Danach entspricht die Aktivität des mitochondrialen Systems etwa 1o Prozent der Einbauraten in den Ansätzen mit freien oder membrangebundenen Polysomen. Die Inkorporation markierter Aminosäuren durch das zum Vergleich isolierte mitochondriale System aus Mäuseleber ist mit 219o dpm/mg Protein dagegen etwas geringer. Bei Messung des Einbaus von markiertem Leucin mit allerdings zehnfach höherer spezifischer Aktivität finden CAMPBELL und Mitarbeiter im säurefällbaren mitochondrialen Protein eine Radioaktivitätsmenge von 1271 cpm / mg (111), während BABITCH unter ähnlichen Bedingungen eine Einbaurate von 2431 cpm/mg Proteolipid angibt (112). Im Gegensatz zu den polysomalen Systemen ist die zellfreie mitochondriale Proteinsynthese weder von der Zugabe " exogener"Enzymfraktionen, noch von der Gegenwart energiereicher Phosphate in den Ansätzen abhängig, ein Ergebnis, das auch von anderer Seite bestätigt wird (111 - 113). Die von CAMPBELL beobachtete Steigerung der Aktivität mitochondrialer Systeme durch ADP oder α- Ketoglutarat finden wir in Übereinstimmung mit BACHELARD (113) nicht , während durch Zugabe von Natriumpyruvat zu den Ansätzen eine deutliche Stimulation der Einbauraten erzielt werden kann.

Unsere Kenntnis der funktionellen Eigenschaften der Synapsen beruht im wesentlichen auf den Ergebnissen einer Vielzahl elektrophysiologischer Untersuchungen (114) , während die biochemischen Grundlagen der Informationsübertragung von einem Neuron auf das andere noch weitgehend unbekannt sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß dem Stoffwechsel der synaptischen Proteine in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zukommt, weil diese sowohl Leistungsträger des Metabolismus der Neurotransmitter als auch strukturelle Bestandteile der synaptischen Membranen sind. Die synaptischen Proteine und Nukleinsäuren werden einmal im Perikaryon der Nervenzellen synthetisiert und durch die axonalen Transportsysteme zu den distalen Nervenendigungen befördert. Darüber hinaus weisen zahlreiche experimentelle Untersuchungen jedoch auch auf eine lokale Proteinsynthese in den Axonen und Synapsen hin (115 - 118). Ein geeignetes System zur in vitro-Untersuchung der synaptischen Proteinsynthese stellen die zuerst von De ROBERTIS und Mitarbeitern (15) sowie von WHITTAKER (16) isolierten Synaptosomen dar, eine aufgrund morphologischer und biochemischer Untersuchungen in vielen Eigenschaften einheitliche Fraktion präterminaler Nervenendigungen.

Die aus Mäusehirn isolierten synaptosomalen Systeme weisen den Systemen mit Mitochondrien ähnliche Eigenschaften auf. So entspricht der Medianwert der Einbauraten mit 2764 dpm /mg synaptosomales Protein (1890 n.) recht genau der Aminosäuren inkorporierenden Aktivität der zellfreien Systeme mit Hirn -Mitochondrien. ADP und α-Ketoglutarat steigern die synaptosomale Proteinsynthese nicht . Zugabe von ATP zu den Ansätzen führt dagegen anders als in den mitochondrialen Systemen zur leichten Stimulierung der Einbauraten um 14 Prozent, während

Natriumpyruvat die Aktivität des synaptosomalen Systems deutlich geringer als das mitochondriale System beeinflußt. Bei Messung der Inkorporation von ^{14}C-Leucin in synaptosomales Protein finden MORGAN und AUSTIN eine Einbaurate von 4oo cpm/mg Protein, die durch Zugabe von ATP zu den zellfreien Ansätzen nicht gesteigert werden kann (119). HERNANDEZ (18) gibt bei Verwendung von ^{3}H-Leucin eine Inkorporation von 21oo cpm/mg Protein an, während AUTILIO und Mitarbeiter (17) bei Einsatz von ^{14}C-Leucin im säurefällbaren Protein eine Radioaktivitätsmenge von 37oo cpm/mg Protein messen. Eine stimulierende Wirkung von α-Ketoglutarat beobachten diese Autoren ebenfalls nicht.

Die sowohl in Zellkörpern und Mitochondrien der Nerven- und Gliazellen als auch in Axonen und Synapsen nachweisbare Peptidknüpfung führt einmal zu der Frage nach der Unabhängigkeit dieser Protein synthetisierenden Systeme voneinander, zum anderen zu Überlegungen über ihre mögliche Bedeutung für besondere Hirnleistungen. Auch im Zentralnervensystem wird die überwiegende Anzahl der Proteine entsprechend der in der DNS derZellkerne enthaltenen Informationen an den cytoplasmatischen Ribonukleoproteid-Partikeln gebildet. Die Proteinsynthese an den Ribosomen der Hirn-Mitochondrien erfolgt dagegen wie auch in anderen Organen teils durch Übersetzung codogener Abschnitte der eigenen DNS, teils gekoppelt an die Funktion der Zellkerne. Die in den Synaptosomen nachweisbare Inkorporation radioaktiver Aminosäuren führt einmal zur Markierung der in den Nervenendigungen befindlichen Mitochondrien (18), anderseits aber auch zu einer radioaktiven Aktivitätsanreicherung in den hochgereinigten synaptosomalen Membranen, die ebenfalls einen deutlich meßbaren Gehalt an

RNS aufweisen (12Q,116). Aufgrund morphologischer Untersuchungen wird von einigen Autoren das Vorkommen von Ribonukleoproteid-Partikeln in den Nervenendigungen verneint (121). Andere Untersucher weisen jedoch auf die Existenz einzelner Ribosomen an den Membranen der synaptischen Vesikeln hin (122-123). Der synaptische Einbau markierter Aminosäuren ist danach einmal das Ergebnis der Protein synthetisierenden Aktivität synaptosomaler Mitochondrien, zum anderen Folge einer Peptidknüpfung im Bereich der synaptischen Membranen. Eine Beteiligung des cytoplasmatischen Apparats an der Translation der genetischen Information in den Nervenendigungen ist durch den Nachweis einzelner Ribosomen jedoch ebenfalls nicht auszuschließen. Schließlich gibt es noch Hinweise für eine Synthese von Proteinen im synaptosomalen Cytoplasma, die weder an die Existenz von Ribosomen noch an das Vorhandensein synaptosomaler Mitochondrien geknüpft zu sein scheint (2o).

Die Möglichkeit eines Nachweises der Autonomie mitochondrialer Proteinsynthese und eines Aufschlußes über die Natur des Protein synthetisierenden Apparates in den Nervenendigungen bietet die Untersuchung der Wirkung spezifischer Inhibitoren. Bei unseren Untersuchungen finden wir erwartungsgemäß eine starke Hemmung des Einbaus markierter Aminosäuren in den zellfreien Systemen mit Hirn-Polysomen durch Puromycin und Cycloheximid, überraschend aber auch eine Verminderung der Einbauaktivität durch Oxy-Tetracyclin. Das zum Vergleich geprüfte bakterielle System aus E. coli MRE 6oo reagiert dagegen fast ebenso empfindlich wie auf Puromycin , auf die Zugabe der Antibiotika Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin mit einer starken Erniedrigung der Einbauraten , während Cycloheximid als spezifischer Blocker der eukaryo-

tischen Proteinsynthese die Inkorporation markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein nicht erniedrigt. Die Unabhängigkeit mitochondrialer Proteinsynthese vom cytoplasmatischen Apparat geht aus der Wirkung der geprüften Inhibitoren deutlich hervor, da der Einbau der Aminosäuren wie im bakteriellen System der Proteinsynthese durch Puromycin, Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin deutlich gehemmt, durch Cycloheximid aber nicht beeinflußt wird. Die vergleichsweise geringere Empfindlichkeit des mitochondrialen Systems kann dabei dadurch erklärt werden, daß die intakte Mitochondrien-Membran eine direkte Wirkung der Inhibitoren auf den Protein synthetisierenden Apparat verhindert. Die im Verhalten gegenüber den Inhibitoren der Proteinsynthese deutlich werdende Ähnlichkeit zwischen mitochondrialem und bakteriellem Apparat der Proteinsynthese führt zu der Frage, ob nicht auch die Hirn-Mitochondrien Überreste ursprünglich in den eukaryotischen Zellen lebender Symbionten sind (124). Die synaptosomale Proteinsynthese unterscheidet sich in der Empfindlichkeit gegenüber den geprüften Inhibitoren qualitativ von dem mitochondrialen System nicht. Cycloheximid hat keinen Einfluß auf die Einbaurate der markierten Aminosäuren, die gemessene schwächere Hemmwirkung von Puromycin, Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin wird auch hier Folge einer Behinderung des Stofftransports durch die synaptosomalen Membranen sein. Diese Ergebnisse könnten die Ansicht von HERNANDEZ bestätigen, der aufgrund der beobachteten Hemmung mitochondrialer und synaptosomaler Systeme aus Rattenhirn durch Chloramphenicol und Puromycin zu der Feststellung kommt, die Proteinsynthese in den präsynaptischen Nervenendigungen sei weitgehend eine Leistung der synaptischen Mitochondrien .

Im Gegensatz zu unseren Resultaten findet dieser Autor jedoch zusätzlich eine deutliche Hemmwirkung des Cycloheximid auf beide Systeme (18). Dieser Cycloheximid-Effekt wird jedoch von DEANIN und GORDON auf eine Verunreinigung der Mitochondrien und Synaptosomen zurückgeführt (125) . HALDAR bestätigt die deutliche Hemmung der Aktivität des mitochondrialen Systems durch Chloramphenicol und Oxy-Tetracyclin während der Einbau markierter Aminosäuren in mitochondriales Protein in einem zellfreien System aus Rattenhirn nicht durch Cycloheximid beeinflußt wird (126). Unterstützt werden diese Ergebnisse auch von RAMIREZ und Mitarbeitern (12o), die nicht nur in kompletten Synaptosomen , sondern auch in gereinigten synaptosomalen Membranen eine deutliche Hemmwirkung des Chloramphenicol, jedoch keinen Effekt des Cycloheximid messen und deshalb die Existenz zweier autonomer Protein synthetisierender Systeme in den Nervenendigungen annehmen : ein System der synaptosomalen Mitochondrien und ein System , das in die synaptische Membran integriert ist. Eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse anderer Autoren weist allerdings daraufhin, daß die Frage nach der Natur der synaptischen Proteinsynthese noch nicht als endgültig geklärt angesehen werden kann (2o, 122 , 123).

Der Nachweis Protein synthetisierender Systeme in den Mitochondrien und Synaptosomen leitet zu der Frage nach ihrer möglichen Bedeutung im Rahmen einzelner Hirnleistungen über. Experimentell begründbare Aussagen lassen sich jedoch zur Zeit hierüber noch nicht machen. Immerhin deutet der Nachweis der Heterogenität der Mitochondrien-Fraktion im Gehirn vielleicht auf eine Spezialisierung ihrer Funktion im Gehirn hin (127).

Die Verknüpfung einzelner Hirnleistungen mit dem Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel dieses Organs ist hinreichend gesichert, eine besondere Bedeutung der ribosomalen, mitochondrialen oder synaptischen Proteinsynthese in diesem Zusammenhang dagegen unklar (71 - 74) . Unsere weiteren experimentellen Bemühungen dienten deshalb dem Ziel, über den Nachweis regulatorischer Vorgänge zu möglichen Hinweisen auf eine unterschiedliche Aktivität dieser Systeme im Rahmen einzelner Hirnleistungen zu gelangen. Ausgehend von dieser Überlegung untersuchten wir zunächst die regulatorischen Mechanismen, die der von zahlreichen Autoren beobachteten Abnahme der Proteinsynthese während der Hirnreifung zugrunde liegen . Diese altersabhängige Reduzierung der Protein synthetisierenden Aktivität wird bisher auf eine Änderung der Eigenschaften entweder der Ribosomen, der Enzymfraktionen, oder aber dieser beiden Komponenten des Protein synthetisierenden Apparats zurückgeführt (62 - 68).

Nach unseren Untersuchungen ist der Gehalt der Gehirne neugeborener und erwachsener Mäuse an extrahierbaren Ribonukleoproteid-Partikeln etwa gleich hoch. Deutliche Unterschiede finden sich jedoch in der auf das Hirngewicht bezogenen Verteilung freier und membrangebundener Polysomen und Ribosomen innerhalb dieser Ribonukleoproteid-Fraktion. So sind die Ribosomen im Gehirn neugeborener Tiere etwa dreimal so häufig an mRNS gebunden und damit als Polysomen extrahierbar wie bei den erwachsenen Tieren. Anderseits nimmt nach unseren Ergebnissen die Anzahl freier Partikel während der Hirnreifung zugunsten einer zunehmenden Bindung an die endoplasmatischen Membranen ab, eine Beobachtung, die allerdings in Widerspruch zu den Mitteilungen von LERNER steht (29). Auch der Gehalt

an extrahierbarer tRNS ist bezogen auf das Organgewicht bei den Neugeborenen etwa doppelt so hoch wie bei den erwachsenen Tieren. DELLWEG und Mitarbeiter kommen bei Untersuchung des Rattenhirns zu dem gleichen Resultat und finden darüber hinaus eine höhere rRNS-Konzentration in den Neugeborenen -Hirnen (128). Da aber auch die Hirn-DNS in den ersten zwei Wochen der postnatalen Hirnreifung eine erhebliche Syntheserate aufweist (129) , ist der gemessene höhere Gehalt der Neugeborenen - Hirne an tRNS und Polysomen möglicherweise nur Ausdruck eines konstanten Mengenverhältnisses zwischen der DNS der Zelle und ihrem Gehalt an tRNS , mRNS oder auch rRNS. In der Tat finden wir nach Bestimmung der DNS-Gehalte im Gehirn neugeborener und erwachsener Mäuse auf der DNS-Basis keine Unterschiede in der tRNS-Konzentration mehr, ein Ergebnis, das mit den Beobachtungen von JOHNSON und CHOU übereinstimmt (13o). Der Gehalt an Polysomen ist im Gegensatz dazu jedoch auch auf der Basis der DNS in den Neugeborenen-Hirnen deutlich erhöht, eine Tatsache, die vielleicht durch die von ZOMZELY und Mitarbeitern angenommene größere Stabilität der mRNS-Ribosomen - Komplexe erklärt werden kann (97).

Im Vergleich zu Polysomen und tRNS ist die Anzahl der aus den Gehirnen neugeborener Mäuse isolierbaren Mitochondrien und Synaptosomen bezogen auf das Organgewicht deutlich niedriger als bei den erwachsenen Tieren. Dieses Resultat überrascht nicht, weil das Neugeborenen-Hirn morphologisch charakterisiert ist durch dicht gepackte Zellkörper von Gliazellen und Nervenzellen, die erst während der postnatalen Hirnreifung durch das Auswachsen der Axone aus den Perikaryen und durch zunehmende Verzweigung der dendritischen Fortsätze differenziert werden (131). Der ebenfalls nachgewie-

sene etwa doppelt so hohe Gehalt der Neugeborenen-Hirne an löslichen, nicht strukturgebundenen Proteinen ist durch den raschen Verlauf der Differenzierungsprozesse in der postnatalen Frühphase erklärbar.

Die Aminosäuren inkorporierende Aktivität der zellfreien Systeme mit Polysomen aus dem Gehirn neugeborener Mäuse entspricht 176 Prozent der Aktivität der Kontroll-Systeme aus erwachsenen Tieren, ein Ergebnis, das mit den Beobachtungen anderer Autoren in vitro gut übereinstimmt (62 - 68). Die in vivo gemessenen Aktivitätsunterschiede beim Einbau markierter Aminosäuren in die Hirnproteine neugeborener und erwachsener Mäuse sind nicht ganz so deutlich (132 - 134). Als Ursache der höheren Einbaurate markierter Aminosäuren finden wir einmal eine gesteigerte Aktivität der Neugeborenen-Polysomen. Diese Eigenschaft ist nicht nur durch die von ZOMZELY angenommene höhere Stabilität der mRNS-Ribosomen - Komplexe im Neugeborenen-Hirn zu erklären, weil ein Poly U abhängiges Poly-Phenylalanin synthetisierendes System mit Neugeborenen-Ribosomen gegenüber den Kontroll-Systemen aus erwachsenen Tieren die gleiche Aktivitätssteigerung aufweist. Dieses Ergebnis deutet demnach auf eine Änderung der Eigenschaften auch der Ribosomen während der Hirnreifung hin und wird von verschiedenen Autoren bestätigt (63,66,67,135,136). Lediglich ZOMZELY (97) sowie FELLOUS und Mitarbeiter (137) finden beim Aktivitätsvergleich der Ribonukleoproteid-Partikel aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn keine signifikanten Unterschiede.

Unabhängig von der höheren biologischen Aktivität der Polysomen und Ribosomen ist der gesteigerte Einbau markierter

Aminosäuren in säurefällbares Protein in den zellfreien Hirnsystemen neugeborener Mäuse auch die Folge einer geänderten Akzeptor- und Transferfunktion der Neugeborenen-tRNS. Unter gleichen experimentellen Bedingungen übersteigt die Aminoacylierung der Neugeborenen-tRNS nämlich die Beladung der Erwachsenen-$tRNS^{Phe}$ um 25, $tRNS^{Lys}$ um 3o ,$tRNS^{Leu}$ um 34 Prozent, die Beladung der $tRNS^{Meth}$ aus Erwachsenen-Hirn sogar um 129 Prozent. Die Beladungsgeschwindigkeit der Neugeborenen-tRNS ist dabei vierfach höher als in den Beladungssystemen mit tRNS und Synthetasen aus Erwachsenen-Hirn. Dieser Effekt ist nicht nur auf eine geänderte Eigenschaft der tRNS, sondern auch auf eine Aktivitätssteigerung der beladenden Enzyme zurückzuführen, da die Neugeborenen-Synthetasen auch die Erwachsenen-tRNS doppelt so schnell beladen wie die gleichaltrigen Enzyme. Nicht nur der Einsatz unbeladener, sondern auch beladener Neugeborenen-tRNS in tRNS-abhängige polysomale Systeme aus Erwachsenen-Hirn steigert die Einbaurate markierter Aminosäuren , ein Hinweis dafür, daß nicht nur die Akzeptor- sondern auch die Transferfunktion der Neugeborenen-tRNS im Vergleich zu der Erwachsenen-tRNS erhöht ist.

Die gefundene Änderung der Akzeptor- und Transferaktivität läßt auf eine regulatorische Funktion der tRNS und ihrer beladenden Enzyme bei der Translation der genetischen Information während der Hirnreifung schließen. Ein solcher regulatorischer Einfluß der tRNS auf die Proteinsynthese ist deshalb nicht überraschend, weil in der Zelle für jede Aminosäure mehrere spezifische isoakzeptierende tRNS-Spezies einerseits sowie eine ebenfalls spezifische Synthetase anderseits zur Verfügung stehen und damit eigentlich schon auf

eine Bedeutung der tRNS hinweisen, die über eine reine Adapter-Funktion hinausgeht. So sind denn auch auf der Ebene der Transkription (mRNS-Synthese) bereits regulatorische Einflüße der tRNS bekannt (138 - 14o). Auf der Translationsebene konnten wir selbst in zwei isogenetischen Mangelmutanten von E. coli eine Änderung der Akzeptor- und Transferaktivität der tRNS in Abhängigkeit von den Ernährungsbedingungen der Bakterien nachweisen, ein Regulationsmechanismus, der außerdem mit der genetischen Kontrolle dieser Mutanten über den RNS-Stoffwechsel verknüpft ist (141).

Die von uns nachgewiesene Steigerung der Akzeptoraktivität der tRNS aus Neugeborenen-Hirn wird bestätigt durch CHOU und JOHNSON , die bei Prüfung der Aminoacylierung der $tRNS^{Phe}$, $tRNS^{Val}$ und $tRNS^{Glu}$ aus neugeborenen Mäusen um 5o bis 1oo Prozent höhere Beladungsgrade finden als bei der Erwachsenen -tRNS (142). Dieses führen sie auf eine Steigerung der Aktivität der ATP(CTP)tRNS-Nukleotidyltransferase zurück , des Enzyms, das verantwortlich ist für den Stoffwechsel der CCA-OH - Endgruppe der tRNS, deren Intaktheit unbedingte Voraussetzung für die Anheftung der Aminosäuren ist (143 - 145). Signifikante Unterschiede in der Bindung präparativ vorbeladener $tRNS^{Phe}$ aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Hirn an die Ribosomen , die als Hinweis auf die Änderung auch der Transferfunktion gedeutet werden könnte, beobachten diese Autoren nicht (146). Die Geschwindigkeiten der Beladungsreaktionen wurden nach unserer Kenntnis in diesem Zusammenhang von anderen Untersuchern noch nicht gemessen. Ähnliches gilt für die Aminoacylierung der $tRNS^{Meth}$, deren auffallend hohe Beladbarkeit im Neugeborenen-System unseres Erachtens mit der Initiator-Funktion der $tRNS_F^{Meth}$ in Zusammenhang zu

bringen ist.

Die Arbeiten anderer Autoren, die sich mit der Synthese der Proteine im Verlauf der Hirnreifung beschäftigen, sind mit unseren experimentellen Untersuchungen schwer zu vergleichen, weil die Aminoacylierung der tRNS dort vielfach in heterologen Beladungssystemen gemessen wird. Die von uns bei der Prüfung der Spezifität der Beladungsreaktion ermittelten Ergebnisse (Tabelle 11) weisen aber nicht nur auf die erwartete Speziesspezifität , sondern auch auf eine Organspezifität der Aminoacylierung hin. Denn nicht nur die tRNS aus Hefe und E. coli wird von der Synthetasen-Fraktion deutlich schlechter beladen als die homologe Hirn-tRNS , sondern auch die unter identischen Versuchsbedingungen isolierte tRNS aus Mäuseleber. Dieses unserer Ansicht nach wichtige Ergebnis wird auch von anderen Untersuchern bestätigt (147 - 149).

Die biologische Aktivität der löslichen Enzyme aus dem Gehirn neugeborener Mäuse ist im Gegensatz zu den Ribonukleoproteid-Partikeln und der tRNS niedriger als bei den erwachsenen Tieren. Dieses gilt mit Einschränkungen auch für die Synthetasen, die trotz vierfach höherer Beladungsgeschwindigkeiten eine bis zu 25 Prozent niedrigere Endbeladung der Neugeborenen-tRNS ($tRNS^{Leu}$) erreichen als die Erwachsenen -Enzyme. Zu dem gleichen überraschenden Resultat kommt auch JOHNSON (15o).

Die Einbauraten markierter Aminosäuren in den zellfreien Systemen mit Mitochondrien aus Neugeborenen-Hirn sind im Vergleich zu den Kontrollen aus Erwachsenen-Hirn um 155 Prozent erhöht, ein Ergebnis, welches auf besonders große Unter-

schiede in der Aktivität des mitochondrialen Systems der Proteinsynthese während der Hirnreifung hinweist. Bei der Untersuchung mitochondrialer Systeme aus Rattenhirn kommen KLEE und SOKOLOFF zu ähnlichen Resultaten (151). Da die bisherigen experimentellen Untersuchungen aber an mitochondrialen Gesamtsystemen durchgeführt wurden, ist die Lokalisierung einzelner regulatorischer Schritte im Ablauf der mitochondrialen Proteinsynthese zur Zeit noch nicht möglich. Nach den Mitteilungen anderer Autoren enthalten die Mitochondrien außer den autonomen Ribonukleoproteid-Partikeln auch eine vom Cytoplasma unabhängige Synthetasen-Fraktion sowie eigene tRNS (152 - 153). Ob eine Änderung der biologischen Aktivität dieser tRNS und der mRNS-Ribosomen - Komplexe aber auch in den mitochondrialen Systemen Ursache der Steigerung des Einbaus markierter Aminosäuren in den zellfreien Ansätzen aus Neugeborenen-Hirn ist, diese Frage werden wir erst nach erfolgreicher Isolierung der Einzelkomponenten des mitochondrialen Apparats der Proteinsynthese beantworten können.

Im Gegensatz zu den zellfreien Systemen der cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinsynthese ist die Einbaurate markierter Aminosäuren in synaptosomales Protein aus Neugeborenen-Hirn fast um die Hälfte niedriger als in den Kontrollansätzen aus erwachsenen Tieren. Da aber nicht einmal die Frage nach der Anzahl autonomer Protein synthetisierender Systeme im Bereich der Synapsen als eindeutig geklärt angesehen werden kann, müßen wir uns zur Zeit lediglich auf die Mitteilung dieses unerwarteten Ergebnisses beschränken, ohne es näher erklären zu können. Wir möchten in diesem Zusammenhang allerdings nicht unerwähnt lassen, daß VERITY und

Mitarbeiter im Gegensatz zu unseren Resultaten einen maximalen Einbau von ^{14}C-Leucin in synaptosomales Protein in zellfreien Systemen aus Hirnrinde und Cerebellum 8 Tage alter Ratten finden , der dann im Alter von 2o bis 25 Tagen rasch auf etwa 25 Prozent der maximalen Einbauraten absinken soll (154). Vergleichbare Ergebnisse anderer Autoren finden wir bei kritischer Durchsicht der Literatur nicht.

Die Verknüpfung von Lernprozessen und der Gedächtnisformation mit dem Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine wird besonders deutlich am Beispiel des Skotophobins. Dieses die Information " Dunkelangst " tragende Peptid wurde zuerst von UNGAR und Mitarbeitern aus dem Gehirn von Ratten isoliert, die im Rahmen bestimmter Lernexperimente ein entsprechend unphysiologisches Verhalten erworben hatten (155 - 156). Auch das künstlich hergestellte Skotophobin besitzt ähnliche verhaltensmodifizierende Eigenschaften (157). Die hier deutlich werdende Wahrscheinlichkeit der Existenz informationstragender Peptide oder Proteine führte uns zu der Überlegung, ob Funktionsstörungen des Gehirns, die sich phänomenologisch in paranoiden oder halluzinatorischen Syndromen äußern, auf molekularer Ebene mit einer Änderung der Protein synthetisierenden Aktivität einhergehen. In diesem Zusammenhang lag es nahe, den Einfluß von Substanzen auf die zellfreien Systeme der Proteinsynthese zu untersuchen, deren pharmakologische Wirkungen auf psychische Funktionen bekannt sind. So gelang uns der Nachweis einer hemmenden Wirkung des Neuroleptikums Chlorpromazin auf die Synthese der Hirnproteine, ein Effekt, dessen Ursache eine selektive Blockierung

der Aminoacylierung der Hirn-tRNS ist (75). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit prüften wir nun am biochemischen Modell des Mäusehirns den Einfluß des Psychotomimetikums D-Lysergsäurebisäthylamid-Tartrat auf die zellfreien Aminosäuren inkorporierenden Systeme.

Nach Zugabe des LSD beobachten wir in allen zellfreien Systemen eine Steigerung des Einbaus markierter Aminosäuren , dessen Maximum bei einer molaren Konzentration der Substanz von $1 \times 1o^{-6}$ liegt. Der stimulierende Effekt des LSD ist dabei am deutlichsten in den Systemen, die aufgrund ihres geringen Reinheitsgrades die Bedingungen in vivo vielleicht am deutlichsten widerspiegeln (Stimulation des mikrosomalen Systems 55 Prozent , des postmitochondrialen Überstands 64 Prozent). Auch die Beladung der $tRNS^{Phe}$, $tRNS^{Lys}$ und $tRNS^{Meth}$ wird durch LSD deutlich erhöht, die Aminoacylierung der $tRNS^{Leu}$ überraschend dagegen eher gehemmt. Im Gegensatz zu dem beobachteten Wirkungsmechanismus des Chlorpromazin ist die Akzeptorfunktion der Hirn-tRNS nicht der einzige Schritt im Ablauf der Proteinsynthese, der durch diese Substanz beeinflußt wird. Denn die Synthese von Poly-Phenylalanin in einem Poly U abhängigen mit ^{14}C-Phe-$tRNS^{Phe}$ gesättigten ribosomalen System wird durch LSD ebenfalls stimuliert. Schließlich erweist sich die in vitro beobachtete Wirkung der Substanz als nicht organspezifisch: auch die Aktivität zellfreier Systeme mit Polysomen aus Mäuseleber wird deutlich gesteigert.

In einem zellfreien System mit Polysomen aus Kaninchenhirn finden HOLBROOK und Mitarbeiter nach Zugabe von LSD in der hohen Konzentration von o,5 bis $1 \times 1o^{-3}$ M keine Änderung des Einbaus markierter Aminosäuren. Etwa 3o Minuten nach Verabreichung der Substanz in vivo beobachten sie jedoch

einen kurzfristigen Zerfall der mRNS-Ribosomen- Komplexe, den sie auf eine Hemmung der Re-Initiation der Proteinsynthese zurückführen (158 - 159). Die Synthese der RNS in isolierten Zellkernen aus Glia- und Nervenzellen wird dagegen durch LSD gesteigert (16o). Andere Autoren berichten über eine Änderung der Basenzusammensetzung der RNS in den Ganglienzellen des Hippokampus nach chronischer LSD- Applikation oder auch über physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen dieser Substanz und der DNS (161-162).
Diese Ergebnisse anderer Autoren deuten wie auch die eigenen Untersuchungen trotz zum Teil widersprüchlicher Resultate daraufhin, daß LSD den Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine im Gehirn beeinflußt. Sichere Aussagen über einen spezifischen Wirkort der Substanz und über mögliche Zusammenhänge mit ihren bekannten psychotropen Eigenschaften sind jedoch nicht zu machen. Dabei lassen schon die erheblichen Unterschiede in der regionalen Verteilung des LSD im Gehirn nach intravenöser Applikation auf die Beeinflußung spezifischer Hirnstrukturen schließen (163). Hier tritt ein generelles Problem neurobiochemischer Tätigkeit zutage. Denn einmal lassen die zur Zeit zur Verfügung stehenden Arbeitsmethoden einen präparative Isolierung der Komponenten des Protein synthetisierenden Apparats aus einzelnen Hirnregionen bei den üblichen Laboratoriumstieren kaum zu ; zum anderen liefert die technisch mögliche analytische Untersuchung der Nukleinsäuren und Proteine einzelner Glia- oder Nervenzellen wenig Informationen über die biologischen Aktivitäten dieser Moleküle.
Die maximale Stimulierung des Einbaus markierter Aminosäuren in den weitgehend ungereinigten zellfreien Systemen mit Mikrosomen und postmitochondrialem Überstand führte uns zu

der Überlegung , ob die beobachtete Wirkung des LSD auf den Protein synthetisierenden Apparat nicht ein indirekter Effekt ist, der durch Wechselwirkungen dieser Substanz mit anderen Zellstrukturen vermittelt wird. Bekannt ist in diesem Zusammenhang bereits, daß LSD die Rezeptorbindung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin beeinflußt (164 - 167). WEISS und Mitarbeiter beschreiben aber darüberhinaus eine inhibitorische Wirkung eben dieser Substanzen auf die Proteinsynthese im Rattenhirn, die ihrerseits durch bestimmte Pharmaka (Haloperidol , Pimozide) modifiziert werden kann (168). Die hier erkennbaren möglichen Zusammenhänge zwischen der Erregungsleitung im Nervensystem und dem Protein synthetisierenden Apparat veranlassten uns zu der Untersuchung des Einflusses der Neurotransmitter auf die zellfreien Hirnsysteme .

Im Gegensatz zu den Mechanismen der Erregungsübertragung an den peripheren Synapsen und neuromuskulären Endplatten ist die Wirkung zentraler Neurotransmitter im Bereich des Rückenmarks, des Hirnstamms und Großhirns nicht genau bekannt. Dieses gilt trotz der nachgewiesenen Funktion als inhibitorischer Neurotransmitter auch für die GABA, deren Einfluß auf die in vitro Proteinsynthese im Gehirn wir deshalb zuerst untersuchten, weil die Verbindung zu den Polyaminen eine regulatorische Bedeutung dieses Transmitters für cerebrale Stoffwechselprozesse am ehesten erwarten läßt (76 - 83). Erste Berichte über eine stimulierende Wirkung der GABA auf die Aktivität zellfreier Systeme mit Ribosomen und Mitochondrien aus Rattenhirn stammen von CAMPBELL und Mitarbeitern (169). Bestätigt wird dieser GABA-Effekt auch durch eine Reihe anderer Autoren (17o - 172); lediglich GOLDBERG fin-

det keinen Einfluß der Substanz auf den Einbau markierter Aminosäuren in mitochondriales oder synaptosomales Protein (173). Wir beobachten in allen zellfreien Systemen aus Mäusehirn nach Zugabe von GABA in einem molaren Bereich von 1×10^{-6} bis 1×10^{-4} eine konzentrationsabhängige Steigerung der Aminosäuren inkorporierenden Aktivität, die in den synaptosomalen und mitochondrialen Systemen am deutlichsten ist (Stimulation durch 1×10^{-4}M GABA : polysomale Systeme = 26 Prozent , mitochondriales System = 37 Prozent , synaptosomales System = 40 Prozent). Die Einbaurate markierter Aminosäuren in den zum Vergleich untersuchten zellfreien Systemen mit Polysomen und Mitochondrien aus Mäuseleber wird dagegen nicht beeinflußt. Auch die Aminoacylierung der $tRNS^{Phe}$, $tRNS^{Lys}$, $tRNS^{Leu}$ und $tRNS^{Meth}$ nimmt durch GABA deutlich zu, ein Ergebnis, welches ebenso mit den Beobachtungen von BAXTER und TEWARI übereinstimmt wie die von uns im Vergleich zu den Lebersystemen gefundene Organspezifität (174 - 175). Der stimulierende Effekt der Substanz auf die Inkorporation markierter Aminosäuren geht verloren in einem zellfreien System, das mit präparativ vorbeladener tRNS gesättigt ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine GABA-Wirkung in der Frühphase der Proteinsynthese hin. Durch die gekreuzte Beladung von tRNS aus Hirn und Leber mit Leber- und Hirn-Synthetasen kommen wir dabei zu dem Schluß, daß der Wirkort der Substanz nicht die Fraktion der beladenden Enzyme, sondern die tRNS selbst ist. Da die Leber-tRNS aber wegen der Spezifität der Aminoacylierung durch die Hirn-Synthetasen erheblich schlechter beladen wird als die homologe Hirn-tRNS, ist dieser Schluß nur unter gewissen Vorbehalten zulässig. BAXTER kommt übrigens aufgrund seiner Ergebnisse zu der Ansicht eines selektiven Einflußes

der GABA auf die Synthetasen.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse deuten auf einen stimulierenden Effekt der GABA auf die zellfreien Aminosäuren inkorporierenden Systeme aus Gehirn hin, dem in den Ansätzen mit Polysomen offenbar eine Änderung der Akzeptorfunktion der tRNS zugrunde liegt. Damit weist diese Substanz ähnliche Eigenschaften auf wie die Polyamine, deren stimulierende Wirkung auf die Proteinsynthese bereits bekannt ist (176). So wurde auch die von uns in einer gesonderten Versuchsreihe untersuchte Aktivität zellfreier Hirnsysteme mit Polysomen und Ribosomen durch Spermidin in einer Konzentration von o,5 bis 1 x $1o^{-3}$ M auf etwa das Doppelte gesteigert. Bei der Prüfung des Einflußes der Polyamine auf die Aminoacylierung der Hirn-tRNS konnten wir allerdings die von anderen Autoren mitgeteilte stimulierende Wirkung dieser Substanzen auf bakterielle Beladungssysteme nicht bestätigen (177 - 178). Dieses mag jedoch an der hohen Magnesium - Konzentration in den optimierten Hirnsystemen liegen, da die Akzeptorfunktion der tRNS durch Polyamine nur bei niedrigen Magnesium-Werten (3 x $1o^{-3}$ M) beeinflußt werden soll (175). Ein den Polyaminen ähnlicher Wirkungsmechanismus der GABA auf die in vitro Synthese der Hirnproteine ist somit nicht auszuschließen. Offen bleiben muß in diesem Zusammenhang jedoch die Frage, ob der stimulierende Einfluß der GABA auf die Inkorporation markierter Aminosäuren in mitochondriales und synaptosomales Protein auf die gleichen Ursachen zurückzuführen ist wie die Aktivitätssteigerung der polysomalen und ribosomalen Systeme.

Die experimentellen Hinweise auf eine regulatorische Funktion

der GABA werfen die Frage nach einer ähnlichen Rolle auch anderer Neurotransmitter im Ablauf der Proteinsynthese auf. Gestützt wird diese Überlegung auch durch die Untersuchungen anderer Autoren, denen zu entnehmen ist, daß verschiedene nervale Reize , die durch Transmitter-Substanzen von einem Neuron auf das andere übertragen werden müssen, zu einer Änderung des Stoffwechsels der Nukleinsäuren und Proteine im Gehirn führen (179 - 182).

Wir finden bei der Prüfung einer Reihe von Substanzen, deren Funktion als chemische Überträger an den Synapsen wahrscheinlich ist, zum Teil sehr unterschiedliche Wirkungen auf die Inkorporation markierter Aminosäuren in den zellfreien Hirnsystemen. So hemmen Glutaminsäure und Asparaginsäure die polysomalen und synaptosomalen Systeme deutlich, während Glycin ähnlich der GABA beide Systeme stimuliert. Azetylcholin und Alanin steigern die Einbaurate in den synaptosomalen Ansätzen, ohne die Aktivität der polysomalen Systeme zu beeinflußen. Noradrenalin hemmt ausschließlich die polysomale Inkorporation markierter Aminosäuren . Dopamin und Serotonin haben auf das polysomale System die gleiche Wirkung, stimulieren jedoch im Gegensatz dazu den Einbau in synaptosomales Protein. Keine der untersuchten Substanzen zeigt einen signifikanten Einfluß auf die Aminoacylierung der $tRNS^{Leu}$ in den zellfreien Beladungssystemen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Resultaten anderer Autoren , so findet sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den von CAMPBELL und Mitarbeitern an zellfreien Systemen mit Ribosomen und Mitochondrien erhobenen Befunden (169), da die Aktivität der von uns geprüften synaptosomalen und mitochondrialen Systeme durch die Transmitter gleichsinnig beeinflußt wird. Die hemmende Wirkung des Serotonin wird auch von

WEISS und Mitarbeitern bestätigt, die ebenso wie ROEL und Mitarbeiter auch nach Verabreichung von L-Dopa in vivo eine erniedrigte Einbaurate markierten Leucins in säurefällbares Hirnprotein messen (183 - 184). HEMMINKI findet in einem zellfreien System mit Polysomen aus Rattenhirnrinde einen deutlichen Hemmeffekt des Serotonin, eine geringe Hemmung durch Noradrenalin, jedoch keinen Einfluß von Azetylcholin auf den Einbau von ^{3}H-Leucin (185). Die Ergebnisse weiterer Autoren sind teils zustimmender, teils widersprüchlicher Natur, sodaß bei kritischer Würdigung der bisher vorliegenden Mitteilungen zusammenfassend festgehalten werden muß, daß die Wirkung der Neurotransmitter auf die Proteinsynthese auch von den experimentellen Untersuchungsbedingungen abzuhängen scheint.

Diese Erkenntnis gibt zu der berechtigten Überlegung Anlaß, ob die in vitro beobachtete Änderung der Einbaurate markierter Aminosäuren tatsächlich einen physiologischen Wirkungsmechanismus der Transmitter auf die Proteinsynthese im Gehirn nachahmt . Einen entscheidenden Beitrag zur Lösung dieser Frage wird unseres Erachtens die Untersuchung der Aktivität des Protein synthetisierenden Apparats in einzelnen Hirnregionen liefern, ein methodischer Weg, den wir mit der Isolierung und Optimierung zellfreier Systeme aus Hirnrinde, Cerebellum und auch Hirnstamm bereits eingeschlagen haben. Ebenso erfolgversprechend scheint uns jedoch die Isolierung der einzelnen Komponenten des Protein synthetisierenden Apparats der Hirn-Mitochondrien zu sein und besonders die weitere Aufklärung der synaptischen Proteinsynthese. Nach Lösung dieser methodischen Aufgaben werden wir dann einmal die Frage zu beantworten haben, ob die Neurotransmitter eine regulatori-

sche Rolle bei der Synthese spezifischer Proteine im Cytoplasma, Mitochondrien oder Synapsen spielen . Schließlich bleibt zu prüfen, ob die Wirkung dieser Substanzen auf den Protein synthetisierenden Apparat nur ein intrazellulärer, oder auch ein interzellulärer Effekt ist, der an den Synapsen von einem Neuron auf das andere übertragen wird .

5. ZUSAMMENFASSUNG

Am biochemischen Modell des Mäusehirns werden der Prozess der Translation im Gehirn und regulatorische Einflüße auf diesen Stoffwechselprozess mit der Technik der zellfreien Proteinsynthese untersucht. Die Bestandteile des Protein synthetisierenden Apparats werden isoliert, die Systeme der cytoplasmatischen, mitochondrialen und synaptosomalen Proteinsynthese werden charakterisiert und optimiert. Dabei ergibt die durch die Hirn-Synthetasen erfolgende geringere Beladung der tRNS aus E. coli, Hefe und Leber im Vergleich zur homologen Hirn-tRNS Hinweise auf eine über die bekannte Spezies-Spezifität hinausgehende Organspezifität der Aminoacylierung. Die Protein synthetisierende Aktivität der cytoplasmatischen Systeme mit freien und membrangebundenen Polysomen und Ribosomen erweist sich als nicht unterschiedlich. Deutlich gehemmt werden diese Systeme durch Puromycin und Cycloheximid, während Oxytetracyclin und Chloramphenicol nur eine geringe oder keine inhibitorische Wirkung haben. Im Gegensatz dazu wird der Einbau markierter Aminosäuren in mitochondriales Protein durch Puromycin, Oxytetracyclin und Chloramphenicol blockiert, durch Cycloheximid jedoch nicht beeinflußt. Dieses Ergebnis bestätigt die Autonomie des Protein synthetisierenden Apparats der Hirn-Mitochondrien. Die gleichsinnige Beeinflussung des synaptosomalen Systems durch diese Inhibitoren der Proteinsynthese zeigt, daß die Aminosäuren inkorporierende Aktivität der synaptischen Nervenendigungen zumindestens teilweise die Proteinsynthese in den synaptischen Mitochondrien wiederspiegelt.

Zur Aufdeckung der regulatorischen Vorgänge, die der Abnahme der Protein synthetisierenden Aktivität im Verlauf der Hirn-

reifung zugrunde liegen , werden die Eigenschaften der zellfreien Systeme aus dem Gehirn neugeborener Tiere mit den Systemen aus Erwachsenen-Hirn verglichen. Bezogen auf das Organgewicht ist in den Neugeborenen-Hirnen der Gehalt an Polysomen auf das Dreifache, der Gehalt an tRNS auf das Doppelte erhöht, die Ausbeute an Mitochondrien und Synaptosomen dagegen deutlich geringer als bei den erwachsenen Tieren. Auf DNS-Basis finden sich dagegen keine Unterschiede in der Konzentration extrahierbarer tRNS, während die Polysomen - konzentration erhöht bleibt. Die Bindung der Polysomen und Ribosomen an die endoplasmatischen Membranen nimmt während der postnatalen Hirnreifung deutlich zu. Die Aminosäuren inkorporierende Aktivität der zellfreien Systeme mit Polysomen und Mitochondrien aus Neugeborenen-Hirn ist erheblich gesteigert, der Einbau der Aminosäuren in synaptosomales Protein dagegen erniedrigt. Ursache dieser Aktivitätsänderung ist in den cytoplasmatischen Systemen die Modifizierung der biologischen Eigenschaften der mRNS-Ribosomen-Komplexe einerseits und der Akzeptor- und Transferfunktion der tRNS anderseits. Dabei ist nicht nur die Endbeladung der spezifischen tRNS, besonders der $tRNS^{Meth}$, deutlich erhöht, auch die Geschwindigkeit der Aminoacylierung ist vierfach höher als in den Beladungssystemen aus Erwachsenen-Hirn.

Die Untersuchung des Einflußes psychotroper Substanzen ergibt einen stimulierenden Effekt des Psychotomimetikums LSD, der in den am wenigsten gereinigten Systemen mit Mikrosomen und postmitochondrialem Überstand am deutlichsten ist. Diese LSD-Wirkung ist nicht organspezifisch, da die Einbaurate markierter Aminosäuren in einem polysomalen System aus Mäuseleber ebenfalls gesteigert wird. Im Gegensatz zu dem aus-

schließlich an die Aminoacylierung der tRNS gebundenen Hemmeffekt des Neuroleptikums Chlorpromazin ist der Wirkort dieser Substanz in den zellfreien Systemen nicht zu ermitteln. Unter der Annahme einer vielleicht indirekten Wirkung auf den Protein synthetisierenden Apparat über Rezeptorproteine der Neurotransmitter wird deshalb der regulatorische Einfluß verschiedener Transmitter-Substanzen auf die zellfreien Systeme geprüft.

Nach Zugabe von GABA findet sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Einbauaktivität der zellfreien Systeme , die in den Ansätzen mit Mitochondrien und Synaptosomen am deutlichsten ausgeprägt ist. Ursache dieses organspezifischen Effekts ist die Stimulierung der Akzeptorfunktion der Hirn-tRNS, nachfolgende Schritte im Ablauf der Proteinsynthese werden nicht beeinflußt. Wirkort der GABA scheint nicht die Fraktion der beladenden Enzyme, sondern die tRNS selbst zu sein.

Durch eine Reihe anderer Neurotransmitter werden die einzelnen zellfreien Systeme in zum Teil sehr unterschiedlicher Weise beeinflußt. Der Nachweis einer spezifischen Wirkung dieser Substanzen auf den Protein synthetisierenden Apparat scheint jedoch erst nach Aufhellung der Natur der synaptischen Proteinsynthese und nach Isolierung zellfreier Systeme aus einzelnen Hirnregionen möglich zu sein.

LITERATURHINWEISE

1. Chargaff, E.,
Experientia 26 , 81o , 197o

2. Heston, L.H.,
Brit. J. Psychiat. 112 , 819 , 1966

3. Ödegard, O.,
Acta Psychiat. Scand. 169 , 94 , 1963

4. Kringlen, E.,
Acta Psychiat. Scand. 178 , 1 , 1964

5. Matthaei, J.H., Nirenberg, M.,
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 47 , 158o , 1961

6. Nirenberg, M., Matthaei, J.H.,
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 47 , 1588 , 1961

7. Weissbach, H., Ochoa, S.,
Ann. Rev. Biochem. 45 , 191 , 1976

8. Revel, M. in
Molecular Mechanisms of Protein Synthesis,
Weissbach, H., Petska, S., eds., p. 254 ,
Academic Press, New York , 1977

9. Revel, M., Groner, Y.,
Ann. Rev. Biochem. 47 , 997 , 1978

1o. Ashwell, M.A., Wonk, T.S.,
Ann. Rev. Biochem. 39 , 251 , 197o

11. Borst, P., Grivell, L.A.,
FEBS-Letters 13 , 73 , 1971

12. Beaty, D.S.,
Sub.- Cell. Biochem. 1 , 1 , 1973

13. Michel, R., Neupert, W.,
Eur. J. Biochem. 36 , 53 , 1973

14. Perlman, S., Penman, S.,
Nature 227 , 133 , 197o

15. De Robertis, E., Rodriguez, D.L.A.,Salganicoff,L., Pellegrino, D.J.A., Zieher, L.H.,
J. Neurochem. 1o , 225 , 1963

16. Whittaker, V.P., Michaelson,J.A., Kirkland,R.J.A.,
Biochem. J. 9o , 223 , 1964

17. Autilio,L.A., Appel,S.H.,Gambetti,P.L.,
Biochemistry 7 , 2615 , 1968

18. Hernandez, A.G.,
Biochem. J. 142 , 7 , 1974

19. Gilbert, J.M.,
J. Biol. Chem. 247 , 6541 , 1972

2o. Carlin, R.K.,
J. Neurochem. 28 , 355 , 1977

21. Campbell, B.N., Sargent, J.R.,
Techniques in Protein Biosynthesis
Vol. 1 , 1967 , Vol. 2 , 1969
Academic Press, London/New York

22. Last, J.A., Laskin, A.J.,
Methods in Molecular Biology Vol. 2 ,
M. Dekker Inc. New York 1972

23. Clouet, D.H., Ratner, M., Williams, N.,
Biochim. Biophys. Acta 123 , 142 , 1966

24. Murthy, M.R.V., Rapoport,D.A.,
Biochim. Biophys. Acta 95 , 121 , 1965

25. Stenzel, K.H., Aronson, R.F., Rubin, A.L.,
Biochemistry 5 , 93o , 1966

26. Munro, A.J., Jackson, R.J., Korner, A.,
Biochem. J. 92 , 289 , 1964

27. Falwey, A.K., Staehelin, T.,
J. Mol. Biol. 53 , 1 , 197o

28. Falwey, A.K., Staehelin, T.,
J. Mol. Biol. 53 , 21 , 197o

29. Lerner, M.P., Wettstein, F.O.,Herschman, H.R.,
J. Neurochem. 18 , 1495 , 1971

3o. Zomzely, C.E., Roberts,S.,Brown,D.M.,Provost,C.,
J. Mol. Biol. 2o , 455 , 1966

31. Wettstein, F.O.,Staehelin,T.,Noll,H.,
Nature 197 , 43o , 1963

32. Bont,S.W., de Vries,M.,Geels,J.,Huizinga,A.,
Eur. J. Biochem. 19 , 211 , 1971

33. Neth, R., Heller, G., Matthaei, J.H.,
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 ,1514,1968

34. Mathias, A.P.,Williamson,R.,Huxley,H.E.,Page,S.,
J. Mol. Biol. 9 , 154 , 1964

35. Mansbridge, J., Korner, A.,
Biochem. J.. 89 , 15 , 1963

36. Zomzely-Neurath, C.E.in
Protein Biosynthesis in Nonbacterial Systems
ed. Last,J.A., Laskin, A.J., p. 147 ,
Marcel Dekker Inc. , New York 1972

37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J.,Farr, A.L.,Randall,R.J.,
J. Biol. Chem. 193 , 265 , 1951

38. v. Ehrenstein, G., Dais, D.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 5o , 81 , 1963

39. Zomzely-Neurath, C.E., York, C., Moore, B.W.,
Arch. Biochem. Biophys. 155 , 58 , 1973

4o. Avital, S., Elson, D.,
Biochim. Biophys. Acta 179 , 297 , 1969

41. Abadon, P.N., Elson, D.,
Biochim. Biophys. Acta 199 , 528 , 197o

42. Solymosy, F., Lazar,G., Bagi, G.,
Anal. Biochem. 38 , 4o , 197o

43. Grivell, L.A., Reijnders, L., Borst, P.,
Biochim. Biophys. Acta 247 , 91 , 1971

44. Wiegers, U., Hilz, H.,
FEBS-Letters 23 , 77 , 1972

45. Loening, U.E.,
Biochem. J. 113 , 131 , 1969

46. Abdel-Latif, A.A.,
Biochim. Biophys. Acta 121 , 4o3 , 1966

47. Avadhani, N.G., Rutman, R.J.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58 ,42 , 1974

48. Mans, A.J., Novelli, G.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 ,54 , 196o

49. Gilbert, J.M., Anderson, W. F. in
Methods in Enzymology, Moldave, K., Grossman, L. eds.
Vol. XX , Part C , p. 542 ,
Academic Press, New York and London 1971

5o. Bhargava, P.M., Pallaiah, T., Premkumar, E.,
J. Theoret. Biol. 29 , 447 , 197o

51. Smith, J.D., Celis, J. E.,
Nature New Biol. 243 , 66 , 1973

52. Celis, J.E., Hooper,M.L., Smith, J.D.,
Nature New Biol. 244 , 261 , 1973

53. Traut, R.R., Monro, R.E.,
J. Mol. Biol. 1o , 63 , 1964

54. Pestka, E.,
Proc. Nat. Acad. Sci.(USA) 69 , 624 , 1972

55. Trakatellis, A.C.,Montjar, M., Axelrod,A.E.,
Biochemistry 4 , 2o65 , 1965

56. Obrig,T.G., Culp,W.J., McKeehan,W.C., Hardesty,B.,
J. Biol. Chem. 246 , 174 , 1971

57. Vasquez, D.,
Biochim. Biophys. Acta 114 , 289 , 1966 b

58. Das, H., Goldstein, A., Kanner, L.,
J. Mol. Pharmacol. 2 , 158 , 1966

59. Firkin, F.C., Linnane, A.W.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 , 398 ,1968

6o. Holmes, I.A., Wild, D.G.,
Biochem. J. 97 , 277 , 1965

61. Laskin, A.J. in
Antibiotics (Gottlieb,D., Shaw, P.D., eds.)
Vol. 1 , 331 , 1967
Springer Verlag, Berlin,Heidelberg,New York

62. Johnson, T.C.,
J. Neurochem. 15 , 1189 , 1968

63. Yamagami, S., Mori, K.,
J. Neurochem. 17 , 721 , 197o

64. Kohl, H.H., Sellinger, O.Z.,
J. Neurochem. 19 , 699 , 1971

65. Yang, J.W., Liu, D.S.H., Richardson, A.,
Mech. Ageing Dev. 6 , 77 , 1977

66. Lerner, M.P., Johnson, T.C.,
J. Biol. Chem. 245 , 1388 , 197o

67. Andrews, T.M., Tata, J.R.,
Biochem. J. 124 , 883 , 1971

68. Fellows, A., Francon, J., Nunez, J., Sokolof, L.,
J. Neurochem. 21 , 211 , 1973

69. Burton, K.,
Biochem. J. 62 , 315 , 1956

7o. Lennox, E.S., Cohn, A.,
Ann. Rev. Biochem. 36 , 365 , 1967

71. Hydeń ,H., Egyhazy, E.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 48 , 1366 , 1962

72. Hydeń ,H., Lange, P.,
Naturwissenschaften 53 , 64 , 1966

73. Hydeń, H.,
Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 6, 187 , 1967

74. Glassman, E.,
Ann. Rev. Biochem. 38 , 6o5 , 1969

75. Goertz, B., Emmerich, B., Kersten, W.,
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 , 793 , 1972

76. Takeuchi, A., Takeuchi, N.,
J. Physiol. (London) 177 , 225 , 1965

77. Otsuka, M., Kravitz, E.A., Potter, D.P.,
J. Neurophysiol. 3o , 725 , 1967

78. Roberts, E., Kuriyama , K.,
Brain Res. 8 , 1 , 1968

79. Kim, K., Tchen, T.T.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 , 99 , 1962

8o. Seiler , N. in
Polyamines In Normal And Neoplastic Growth
(D.H. Russel , ed.) p. 137 ,
Raven Press , New York , 1973

81. Fischer, H.A., Korr, H., Seiler, N., Werner, G.,
Brain Res. 39 , 197 , 1972

82. Tabor, H., Tabor, C.W.,
Adv. Enzymol. 36 , 2o3 , 1972

83. Bachrach , U.,
Function Of Naturally Occuring Polyamines.
Academic Press, New York , 1973

84. Tallan, H.H. in
Amino Acids Pools (J.T. Holden,ed.) p. 471 ,
Elsevier , Amsterdam , 1962

85. Popov, N., Pöhle, W., Rosler, V., Matthies, H.,
Acta Biol. Med. Ger. 18 , 695 , 1967

86. Utley, J.D.,
Biochem. Pharmacol. 12 , 1228 , 1963

87. Strasberg, P., Krnjevic, K., Schwartz, S., Elliot,K.A.C.,
J. Neurochem. 14 , 755 , 1967

88. Hanzon, V., Toschi, G.,
Exptl. Cell Res. 21 , 332 , 196o

89. Rendi, R., Hultin, T.,
Exptl. Cell Res. 19 , 253 , 196o

9o. Satake, M., Mase, K., Takahashi, Y., Ogata, K.,
Biochim. Biophys. Acta 41 , 366 , 196o

91. Takahashi, Y., Mase, K., Sugano, H.,
Biochim. Biophys. Acta 119 , 677 , 1966

92. Campagnoni, A.T., Mahler, H.R.,
Biochemistry 6 , 956 , 1967

93. Peterman, M.L.,
The Physiological and Chemical Properties of Ribosomes
American Elsevier Publish. Co. , New York , 1964

94. Rosbash, M., Penman, S.,
J. Mol. Biol. 59 , 227 , 1971

95. Merits, J., Cain, J.C., Rdzok , E.J., Minard, F.N.,
Experientia 25 , 739 , 1969

96. Mugnaini, E., Walberg, F.,
Ergebn. Anat. Entwicklung. 37 , 194 , 1964

97. Zomzely, E., Peache, S., Brown, D. M.,
J. Biol. Chem. 246 , 2o97 , 1971

98. Roberts, S., Zomzely, C.E., Bondy, S.C. in
Cellular Aspects of Neural Growth and Differentiation
UCLA Forum in Medical Sciences No 14 , Ch. 2o , p. 447,
(Pease, D.C. , ed.)
University of California Press, Los Angeles , 1971

99. Andrews, T.M., Tata, J.R.,
Biochem. J. 124 , 883 , 1971

1oo. Murthy , M.R.V.,
J. Biol. Chem. 247 , 1936 , 1972

1o1. Schumacher, G., Ehring, R.,
Molec. gen. Gen. 124 , 329 , 1973

1o2. Singer, R.H., Penman, S.,
J. Mol. Biol. 78 , 321 , 1973

1o3. Pestka, S., Goorha, R., Rosenfeld, H., Neurath, C.,
Hintikka , H.,
J. Biol. Chem. 247 , 4258 , 1972

1o4. Mc Lean, J.R., Cohn, G.L., Brandt,J.K., Simpson, M.V.,
J. Biol. Chem. 233 , 657 , 1958

1o5. Klee, C.B., Sokoloff, L.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 53 ,1o14 , 1965

1o6. Hirsch, M., Penman, S.,
J. Mol. Biol. 8o , 379 , 1973

1o7. Barath, Z., Küntzel, H.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69 ,1371 , 1972

1o8. Kadenbach, B.,
Biochim. Biophys. Acta 134 , 43o , 1963

1o9. Beattie, D.S., Basford, R.E., Koritz, S.B.,
Biochemistry 6 , 3o99 , 1967

11o. Coote, J.L., Work, T.S.,
Europ. J. Biochem. 23 , 564 , 1971

111. Campbell, M.K., Mahler, H.R., Moore,W.J., Tewari, S.,

112. Babitch, J.M.,
Brain Res. 49 , 135 , 1973

113. Bachelard, H.S.,
Biochem. J. 1oo , 131 , 1966

114. Eccles , J.C.,
The Physiology of Synapses.
Springer Verlag, Berlin,Heidelberg,New York 1964

115. Edström, A.,
J. Neurochem. 14 , 239 , 1967

116. Austin, L., Morgan, I.G.,
J. Neurochem. 14 , 377 , 1967

117. Koenig, E.,
J. Neurochem. 14 , 437 , 1967

118. Giuditta, A., Dettbarn, W.D., Brzin, M.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 59 ,1284 , 1968

119. Morgan, J.E., Austin, L.,
J. Neurochem. 15 , 41 , 1968

12o. Ramirez, G., Levitan, J.B., Mushynski, W.E.,
J. Biol. Chem. 247 , 5382 , 1972

121. Palay, S.L., Palade, G.E.,
J. Biochim. Biophys. Cytol. 1 , 69 , 1955

122. Cotman, C.W., Taylor, D.A.,
Brain Res. 29 , 366 , 1971

123. Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L.A., Gonatas, N.K.,
Shafer, B.,
J. Cell Biol. 52 , 526 , 1972

124. Roodyn, D.B. , Wilkie , D.,
The Biogenesis of Mitochondria.
Methyen , London , 1968

125. Deanin, G.G., Gordon, M.W.,

126. Hadar, D.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 , 899 , 1971

127. Blokhuis, G. D., Veldstra, H.,
FEBS - Letters 11 , 197 , 197o

128. Dellweg, H., Gerner, R., Wacker, A.,
J. Neurochem. 15 , 11o9 , 1968

129. Adams, D.H.,
Biochem. J. 98 , 636 , 1966

13o. Johnson, T.C., Chou, L.,
J. Neurochem. 2o , 4o5 , 1973

131. Folchi-Pi, I.in
Chemistry and Brain Development p. 1
Paoletti, R., Davison, A.N.,eds.
Plenum Press, New York , 1971

132. De Vellis, J., Schjeide, O.A., Clemente, C.D.,
J. Neurochem. 14 , 499 , 1967

133. Schain, R.J., Carver, M.J., Copenhaver, H.J.,
Pediat. Res. 3 , 135 , 1969

134. Szijan, J., Kalberman, L.E., Gomez, C.J.,
Brain Res. 27 , 3o9 , 1971

135. Mc Innes, J.W., Schlesinger, K.,
Brain Res. 29 , 2o1 , 1971

136. Harris, C.L., Maas, J.W.,
J. Neurochem. 22 , 741 , 1974

137. Fellous, A., Francon, J., Nunez, J., Sokoloff , L.,
J. Neurochem. 21 , 211 , 1973

138. Sharma, O.K., Mays, L.L., Borek, E.,
J. Biol. Chem. 248 , 7622 , 1973

139. Ilan, J., Ilan, J., Patel, N.,
J. Biol. Chem. 245 , 1275 , 197o

14o. Scherberg, N.H., Weiss, S.B.,

141. Emmerich, B., Goertz, B., Kersten, H.,
FEBS - Letters 21 , 244 , 1972

142. Chou, L., Johnson, T.C.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47 , 824 , 1972

143. Chou, L., Johnson, T.C.,
Brain Res. 45 , 217 , 1972

144. Hecht, L.J., Stephenson, M.L., Zamecnik, P.C.,
Biochim. Biophys. Acta 29 , 46o , 1958

145. Hecht, L.J., Stephenson, M.L., Zamecnik, P.C.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 45 , 5o8, 1959

146. Chou, L., Lerner, M.P., Johnson, T.C.,
J. Neurochem. 18 , 2535 , 1971

147. Hatfield, D., Portugal, F.H.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 67 , 12oo , 197o

148. Taylor, M.W., Granger, G.A., Buck, C.A., Holland, J.J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 57 , 1712 , 1967

149. Hatfield, D., Caicuts, M.,
Federation Proc. 28 , 349 , 1969

15o. Johnson, T.C.,
J. Neurochem. 16 , 1125 , 1969

151. Klee, C.B., Sokoloff , L.,
J. Neurochem. 11 , 7o9 , 1964

152. Barnett, W.E., Brown, D.H.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 57 , 452 , 1967

153. Barnett, W.E., Brown, D.H,, Eppler, J.L.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 57 ,1775 , 1967

154. Verity, M.A., Brown, W.J., Cheung, M., Hutsman, H.,
Smith , R.,
J. Neuroscience Res. 2 , 323 , 1976

155. Ungar, G., Irwin, L.N.,
Nature 214 , 453 , 1967

156. Ungar, G., Galvan, L., Clark, R.H.,
Nature 217 , 1259 , 1968

157. Parr, W., Holzer, G.,
Hoppe Seyler 's Z. Physiol Chem. 352 , 1o43,1971

158. Holbrook, L., Brown, J.R.,
J. Neurochem. 27 , 77 , 1976

159. Holbrook, L., Brown, J.R.,
J. Neurochem. 29 , 461 , 1977

16o. Brown, J.R.,
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72 , 837 , 1975

161. Neuhoff, V.,
Arzneimittelforschung 17 , 176 , 1967

162. Yielding, K.L. Sterglanz, H.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128 , 1o96 , 1968

163. Snyder, S.H., Reivich, M.,
Nature 2o9 , 1o93 , 1966

164. Bennet, J.P., Snyder, S.H.,
Brain Res. 94 , 523 , 1975

165. Fillion, G., Fillion, M.P., Spirakis, M.C.,
Bauers, J.M., Jacob, J.,
Life Sci. 18 , 64 , 1976

166. Sato, M., Sawada, M.,
Neuropharmacology 14 , 883 , 1975

167. von Hungen , K., Roberts, S., Hill, D.F.,
Brain Res. 94 , 57 , 1975

168. Weiss, B.F., Liebschutz, J.L., Wurtmann, R.J., Munro,H.,
J. Neurochem. 24 , 1191 , 1974

169. Campbell, M.K., Mahler, H.R., Moore, W.J., Tewari, S., Biochemistry 5 , 1174 , 1966

17o. Tewari, S., Baxter, C.F., J. Neurochem. 16 , 171 , 1969

171. Snodgrass, S.R., Brain Res. 59 , 339 , 1973

172. Tapia, R., Sandoval, M.E., Brain Res. 69 , 255 , 1974

173. Goldberg, M.A., Brain Res. 39 , 171 , 1972

174. Baxter, C.F., Tewari, S. in Protein Metabolism of the Nervous System (Laijtha , A., ed.) p.439 Plenum Press, New York , 197o

175. Baxter, C.F., in GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., Tower, D.B.,eds.) p. 89 Raven Press , New York , 1976

176. Giorgi, P.P., Biochem. J. 12o , 643 , 197o

177. Takeda, Y., Ignashi, K., Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 ,917 , 1969

178. Matzuzaki, K., Tayada, Y., Biochim. Biophys. Acta 3o8 , 339 , 1973

179. Prives, C., Quastel, J.H., Nature 221 , 1o53 , 1969

18o. Jones, D. A., Mc Ilwain , H., J. Neurochem. 18 , 41 , 1971

181. Wasterlain, C.G., Neurology 24 , 175 , 1974

182. Jethmal , E., Koenig , E.,
Nature (New Biol.) 241 , 28 , 1973

183. Weiss, B.F., Roel, L.E., Munro, N., Wurtman, R.J.,
Adv. Neurol. 5 , 87 , 1974

184. Roel, L.E., Schwartz , S.A., Munro, N., Wurtman, R.J.,
J. Neurochem. 23 , 233 , 1974

185. Hemminki, K.,
J. Neurochem. 19 , 2699 , 1972

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. A. Hopf bin ich für sein stets förderndes,wohlwollendes Interesse an meiner Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Meine Mitarbeiterinnen Frl. Brita Zilz und Frl. Petra Lüder leisteten bei der experimentellen Durchführung großen Einsatz und wertvolle Hilfe. Frau Brigitte Rohbeck danke ich für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien und Synaptosomen.